Emilia Rappocciolo

Influenza Report 2006

Adattato da
Influenza Report 2006
di B. S. Kamps, C. Hoffmann e W. Preiser
www.InfluenzaReport.com

Postilla

La medicina e' un campo in continua evoluzione. Gli editori e gli autori dell' **Influenza Report** si sono sforzati di mantenere un'informazione accurata e completa al momento della pubblicazione. Tuttavia, considerata la velocita'

dei cambi nel campo delle scienze mediche, delle politiche di prevenzione delle malattie, cosi' come la possibilita' di errore umano, questo sito puo' contenere certe inaccuratezze technice, tipografiche o errori di altro tipo. Consigliamo ai lettori di controllare dal produttore di ogni farmaco che deve essere somministrato le informazioni sui prodotti farmaceutici disponibili al momento in modo da verificarne la dose raccomandata, la durata dela somministrazione, e le controindicazioni. La responsabilita' di determinare i dosaggi e il miglior trattamento per il paziente risiede col medico curante che agisce in base alla sua esperienza e alla conoscenza del singolo paziente. L'informazione qui inclusa e' da prendere per quello che presenta e senza alcuna garanzia. I contribuenti a questo sito, incluso Flying Publisher, rinnega ogni responsabilita' per risultati ottenuti in seguito all'informazione qui inclusa.

Importante: il libro nella sua forma corrente e' disegnato per propositi esclusivamente educativi e non ha intenzione di provvedere consigli medici o servizi di tipo professionale. L'informazione contenuta in questo libro non deve essere usata ne' per la diagnosi ne' per il trattamento di un problema medico o di una malattia. Non e' un sostitutivo della cura medica professionista. I membri del pubblico che fanno uso di questo libro sono consigliati di consultarsi con un medico per quanto riguarda la cura medica personale. Se avete un problema di salute o sospettate di avere un problema di salute, consultate il vostro medico curante.

Chapter 1: Influenza

Bernd Sebastian Kamps and Gustavo Reyes-Terán

Una pandemia influenzale ci puo’ far pensare a disastri naturali : sappiamo che ce ne sara’ un altro, ma non sappiamo ne' quando ne’ quanto importante sara’ in fatto di dimensioni e impatto. E' anche pero' vero che, sotto molti punti di vista,' ci sono differenze fra le pandemie influenzali e i disastri naturali. Un terremoto a Tokio o San Francisco puo' durare secondi o un paio di minuti – la diffusione nel caso di pandemie accade in ondate successive che possono durare mesi o un paio d’anni. Ugualmente diverse sono le conseguenze: una pandemia influenzale puo’ essere migliaia di volte piu’ mortale del piu’ micidiale degli tsunami.

Cosi’ come sono imprevedibili le pandemie, altrettanto imprevedibile puo’ essere lo stesso virus. Non sappiamo nulla della potenzialita’ patogenica della prossima varieta’ che potrebbe causare una pandemia. La prossima pandemia potrbbe essere relativamente benigna, cosi’ come fu nel 1968 e nel 1957, o veramente maligna, come fu nell’episodio verificatosi nel 1918. Non sppiamo se la prossima pandemia sara’ causata dalla corrente “bestia nera”, H5N1, o da un altro tipo di virus. Non sappiamo come la prossima pandemia evolvera' nel tempo, con che velocita’ si propaghera' nel mondo, e in quante ondate. Non sappiamo quali fasce d’eta’ saranno ad alto rischio di sviluppare complicazioni gravi. Siamo completamente al buio sul numero di individui che saranno vittime dalla prossima pandemia: 2, 20 o 200 milioni?

Non c'e' da sorprendersi del fatto che i professionisti della sanita’ stanno diventando sensibili ai rischi di una nuova pandemia. L’attuale epidemia di H5N1 fra gli uccelli, con la concomitante trasmissione occasionale ad esseri umani, sta causando grande preoccupazione a causa degli interessanti paralleli tra il virus H5N1 e la varieta’ di influenza del 1918. Se H5N1 dovesse acquisire la capacita’ di essere facilmente trasmesso da individuo a individuo, persino lo scenario piu’ conservatore prevede piu’ di 100 milioni di pazienti non ospitalizzati, piu’ di 25 milioni di pazienti ospitalizzati, e parecchi milioni di decessi nel mondo (WHO Checklist 2005).

Quando si affronta un pericolo sconosciuto e’ saggio immaginare e pianificare per il peggio. Se si considera che il pericolo e’ di natura globale, e’ necessario che le strategie per affrontarlo siano globali – un compito arduo se si considera che il nostro pianeta e’ diviso in piu’ di duecento nazioni. Avere rapporti con nazioni e i loro leader e’ come avere a che fare con bambini in un asilo materno. In questo contesto, l’organizzazione mondiale per la sanita’ (WHO) sta compiendo un lavoro encomiabile.

Nei paragrafi che seguono, esamineremo i vari aspetti della guerra all’influenza: l’impatto globale e individuale della malattia, lo stesso virus, e la gestione individuale e globale di quella che un giorno potrebbe rivelarsi una delle piu’ importanti crisi della sanita’ nella storia della medicina. La cosa piu’ importante da ricordare quando si parla di pandemia influenzale e’ che la sua forma piu’ grave ha poco in comune con l’influenza stagionale. Una pandemia influenzale non e’ cosa

da tutti i giorni. Questo va ricordato. Non e' consigliabile trattare una tigre come fosse un gatto.

Impatto Mondiale

Epidemie e pandemie.

L'influenza e' una grave malattia respiratoria che puo' essere estenuante e causare complicazioni che possono portare a ospitalizzazione e decesso, soprattutto negli anziani. Ogni anno il conto mondiale delle **epidemie** influenzali e' probabilmente di 3-5 milioni di casi con malattia grave e 300,000 – 500,000 decessi. Il rischio di malattia grave e morte e' maggiore tra individui di eta' > 65 anni, bambini di eta' < 2 anni, e in persone che soffrono di condizioni mediche che le collocano a maggior rischio di sviluppare complicazioni dovute a influenza (CDC 2005)

Nuove varieta' di virus A dell'influenza in grado di causare epidemie vengono alla luce ogni anno o due grazie all'introduzione di specifiche mutazioni puntiformi in due glicoproteine presenti sulla superficie del virus: emagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA). Le nuove varieta' sono in grado di eludere le difese dell'ospite umano e di conseguenza non si verifica (contariamente a quanto accade con vaiolo, febbre gialla, poliomielite, e morbillo) un' immunita' durevole contro il virus ne' dopo infezione per vie naturali ne' dopo vaccinazione. Questi cambi nell' antigenicita' dei virus A dell'influenza, che sono permanenti e di piccola entita', vengono chiamati "antigenic drift" (deriva antigenica) e sono alla base della regolarita' nell' occorrenza delle epidemie influenzali (Figura 1). In aggiunta, e' possibile provare che discendenze multiple di uno stesso sottotipo di virus possono co-circolare, persistere, e riassortire seguendo modalita' epidemiologicamente significative (Holmes 2005).

Al contrario dalle epidemie, le **pandemie** sono occasionali e occorrono con una frequenza che va dai 10 ai 50 anni. Sono documentate storicamente fin dal XVI secolo (WHO 2005b) con almeno 31 pandemie documentate negli ultimi 400 anni (Lazzari 2004). Durante il ventesimo secolo, si sono verificate tre pandemie influenzali (tabella 1). Il loro impatto dal punto di vista della mortalita' varia da devastatore a moderato o tenue (Simonson 2004). La pandemia del 1918 fu causata da un virus H1N1 di origine apparentemente aviaria (Reid 1999), mentre le varianti che causarono le pandemie successive – H2N2 nel 1957 e H3N2 nel 1968 – furono virus riassortiti che contenevano geni derivati da virus aviari: tre nel 1957 (emagglutinina, neuramindase, e RNA polimerase PB1) e due (emagglutinina e PB1) nel 1968 (Kawaoka 1989). Cambi di questo genere che alterano l'antigenicita' di un virus influenzale in maniera drammatica sono definiti "antigenic shift" (spostamento antigenico) (Figura 2)

Tabella 1 Antigenic shifts e Pandemie*

	Designazione	Pandemia	Mortalita'
1889	H3N2	Moderata	?
1918	H1N1 ("Spagnola")	Devastatrice	50–100 milioni
1957	H2N2 ("Asiatica")	Moderata	1 milione
1968	H3N2 ("Hong Kong")	Tenue	1 milione
?			

* H = emagglutinina; N = neuraminidase

Le pandemie influenzali circolano nel mondo in ondate successive, e non c'e' modo di prevenire la diffusione di nuovi virus influenzali di natura pandemica. La nuova variante virale col tempo arrivera' ovunque, e infettera' praticamente ogni essere umano in un periodo di pochi anni. Eccessi di mortalita' stagionali dovuti a polmoniti ed influenza possono rimanere elevati per molti anni, cosi' come si e' verificato negli Stati Uniti nella stagione dominata da A (H3N2) nei dieci anni successivi al 1968, in individui di eta' compresa fra i 45 e i 64 anni (Simonsen 2004).

Un marchio delle pandemie influenzali e' lo spostamento della mortalita' verso fasce di eta' inferiori. Meta' dei decessi dovuti ad influenza durante la pandemia del 1968, e una sostanziale proporzione di decessi dovuti ad influenza nelle pandemie del 1957 e 1918, accaddero tra individui di eta' inferiore ai 65 anni (Simonson 1998).

1918

La prima pandemia influenzale del XX secolo si diffuse piu' o meno simultaneamente in tre ondate differenti durante un periodo di 12 mesi nel 1918-1919, attraverso l'Europa, l'Asia, e il Nord America (Barry 2004, Taubenberger 2006). E' stata, storicamente, la pandemia peggiore che uccise piu' persone della Prima Guerra Mondiale, ed e' generalmente accettato che piu' di 50 milioni di persone morirono a causa di questa pandemia (Johnson 2002). La prima ondata, che inizio' durante la primavera del 1918, fu altamente contagiosa ma non particolarmente letale. Solo la seconda ondata, che inizio' in settembre, distribui' il tipo letale di influenza.

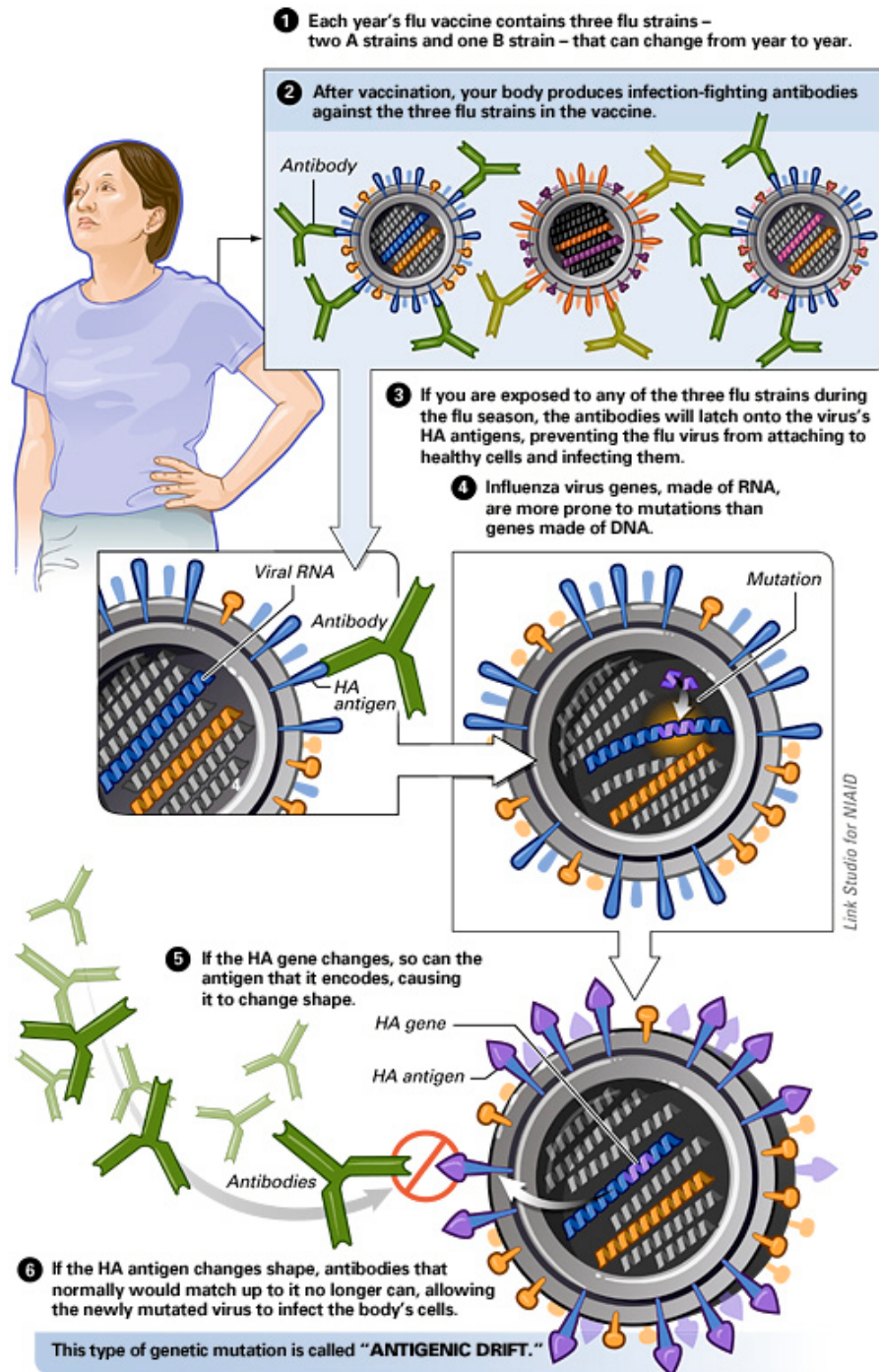



Figure 1. Antigenic drift. Courtesy: National Institute of Allergy and Infectious Disease

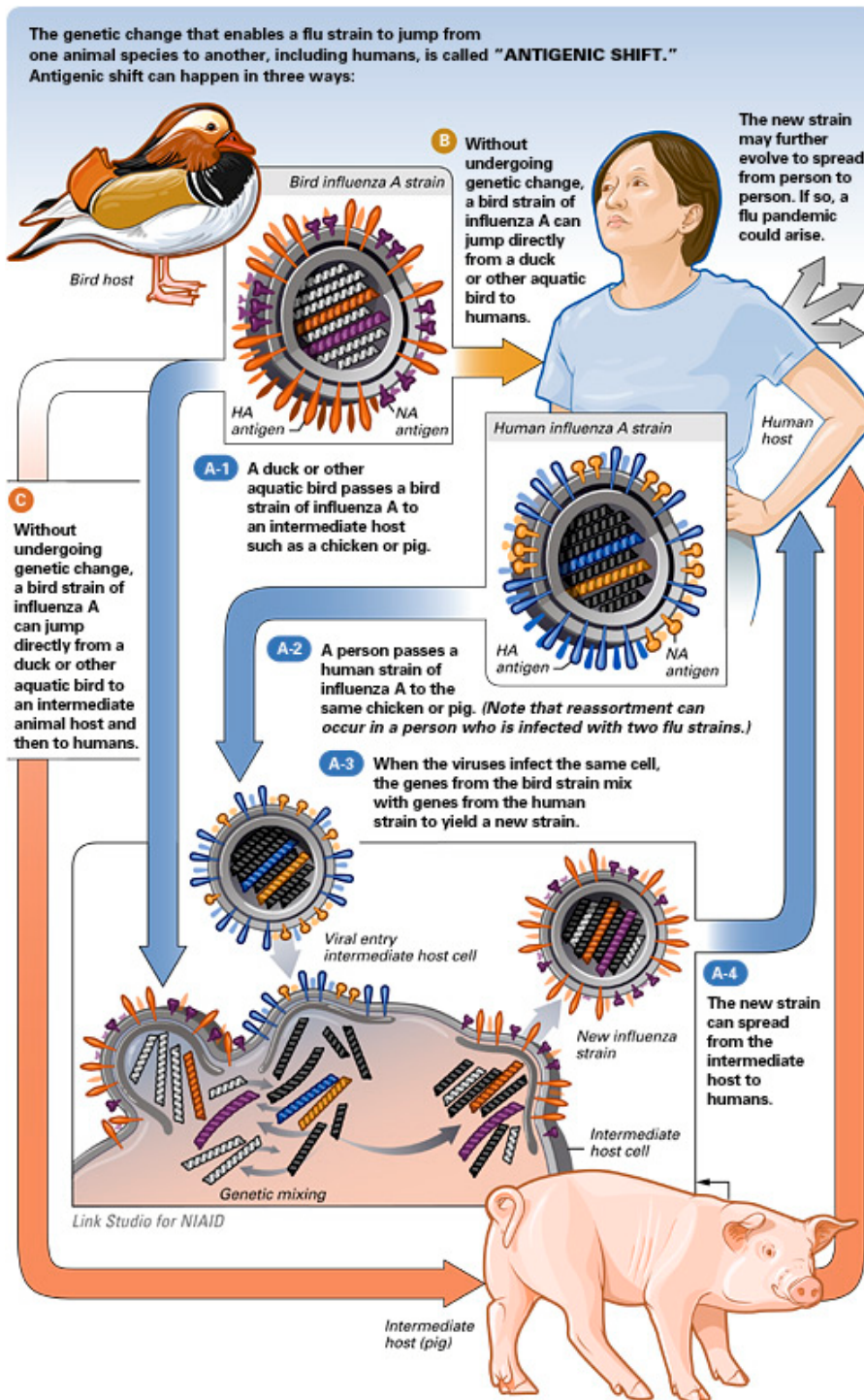



Figure 2. Antigenic shift. Courtesy: National Institute of Allergy and Infectious Disease

Figura 3. Ospedale d'emergenza durante l'epidemia di influenza, Camp Funston, Kansas. Figura dell' epidemia di influenza del 1918. Copyright:National Museum of Health & Medicine, Washington, D.C. http://InfluenzaReport.com/link.php?id=19

Il virus del 1918 fu estremamente virulento e causo' molti decessi da polmonite batterica secondaria. La polmonite virale primaria fu in grado di uccidere individui sani e in giovane eta' nello spazio di due giorni. Il decorso clinico dei casi gravi si presento' in modo cosi' diverso che i ricercatori dubitarono che si trattasse di influenza (WHO 2005b). I sintomi nel 1918 furono cosi' diversi dal solito che, inizialmente, vennero incorrettamente diagnosticati come dengue, colera o tifo (Barry 2004). In casi meno gravi, la maggioranza dei pazienti presento' un' influenza tipica con febbre per 3-5 giorni seguita da completa guarigione (Kilbourne 2006). Contrariamente a quanto accadde in pandemie successive, la maggior parte dei decessi durante la pandemia del 1918 avvenne fra persone giovani e di sana costituzione di eta' compresa fra i 15 e i 35 anni, e il 99% dei decessi si verifico' fra persone di eta' inferiore ai 65 anni.

Il ritrovamento dell' RNA genomico del virus del 1918 da un' autopsia polmonare conservata in formalina e da tessuto polmonare congelato e non fissato di una vittima dell'influenza che fu sepellita in permafrost nel novembre del 1918 (Taubenberger 1997), ha permesso di codificare la sequenza completa di tutti e otto i segmenti di RNA genomico del virus H1N1 del 1918 (Taubenberger 2005). Questo studio concluse che il virus del 1918 non fu un virus riassortito

(come invece furono quelli delle pandemie del 1957 e 1968), ma piu' probabilmente un virus di tipo completamente aviario che si adatto' all'ospite umano.

1957

La pandemia del 1957 fu causata dal virus H2N2, un virus clinicamente piu' mite rispetto a quello che causo' la pandemia del 1918. La propagazione fu spesso di tipo esplosivo, ma la mortalita' fu molto piu' contenuta. I decessi seguirono un decorso clinico piu' caratteristico, simile a quello visto nelle epidemie stagionali, con la maggior parte dei decessi in eccesso in infanti e anziani (WHO 2005b). Il rischio piu' elevato di sviluppare complicazioni polmonari si presento' in pazienti con malattie croniche subalterne e in donne gravide (Louria 1957). L'eccesso di mortalita' globale durante la pandemia del 1957 e' stato stimato a 1-2 milioni di decessi.

1968

Anche la pandemia del 1968 fu una pandemia mite. L'impatto della mortalita' non fu nemmmeno particolarmente grave in confronto alle gravi epidemie del 1967-1969 (l'ultima epidemia da H2N2) e alle due epidemie gravi del 1975-1976 e del 1980-1981 (Simonsen 2004). I decessi sono stimati a circa un milione, e negli Stati Uniti, circa il 50 per cento di tutti i decessi causati da influenza si verificarono in individui di eta' inferiore ai 65 anni. Studi siero-archeologici mostrano che la maggior parte degli individui di eta' uguale o superiore ai 77 anni, presentarono anticorpi H3 prima di essere esposti al nuovo virus pandemico (Dowdle 1999) e che gli anti-H3 anticorpi presenti potrebbero aver protetto gli anziani (eta' > 77 anni) durante la pandemia H3N2 del 1968.

Dal 1968, c'e' stato un solo caso – nel 1976 – in cui l'inizio di una nuova pandemia fu erroneamente previsto (Dowdle 1997, Gaydos 2006, Kilbourne 2006).

Situazione attuale

Pandemie di dimensioni notevoli sono accadute durante il corso della storia con una frequenza di 30 anni ed esiste un consenso generale che ci sara' un'altra pandemia influenzale. E' impossibile prevedere di quale tipo di influenza sara' il prossimo virus pandemico. Un possibile candidato e' il tipo H5N1 dell'influenza aviaria che e' diventato endemico in uccelli acquatici e in pollame domestico in molte parti del Sud Est Asiatico, e che recentemente si sta diffondendo in Asia, Europa ed Africa. Dati recenti hanno dimostrato che il cambio di soli dieci amminoacidi nelle polimerasi virali distinguono le sequenze del virus del 1918 da quelle dei virus aviari, e che in numerosi casi le stesse differenze sono state riscontrate in virus altamente patogenetici H5N1 in circolazione (Taubenberger 2005).

Al momento, l'influenza aviaria rimane prevalentemente una malattia aviaria,. La barriera interspecie e' significativa: nonostante l'infezione di milioni di uccelli di pollame distribuiti su grandi aree geografiche per piu' di due anni, sono stati confermati in laboratorio meno di 200 casi in esseri umani (WHO 200601). I primi casi in esseri umani documentati nel 1997 (Yuen 1998), coincisero con epidemie nel pollame di influenza aviaria da H5N1 altamente patogenico.

Il contagio da persona a persona del virus H5N1 fu riportato come molto limitato in personale sanitario e in familiari con contatto diretto con una persona infetta (Katz 1999, Buxton Bridges 2000). Sebbene anticorpi H5 furono rivelati in questi gruppi, indicando infezione con il virus, nessun caso di malattia grave fu riportato.

Questi sono solo alcuni dati che indicano il grado di infezione asintomatica o di lieve malattia che avviene dopo infezione con le varieta' altamente patogeniche di virus aviario H5N1. Se le infezioni asintomatiche fossero frequenti, il 55% di mortalita' dei casi di malattia grave da H5N1 in esseri umani riportata fino al marzo 2006 (WHO 20060321) sarebbe ovviamente meno allarmante. Tuttavia, questi episodi potrebbero essere un'eccezione, almeno in certe circostanze. In uno studio condotto in un villaggio Cambogiano con epidemie di H5N1 nel pollame e 4 casi umani mortali, l'esame del sangue di 351 abitanti verifico' l'assenza di ulteriori infezioni, sebbene molti degli abitanti avessero avuto notevole contatto con pollame infetto (ProMED 20060322.0893 e Buchy, comunicazione personale).

Fino ad ora, la malattia ha colpito prevalentemente bambini e giovani adulti. Dei 116 pazienti per i quali sono disponibili dati demografici sul website della WHO dal dicembre 2003 fino al 9 febbraio 2006, il 50 % e' di eta' uguale o inferiore ai 16 anni, il 75% e' di eta' inferiore ai 30 anni e il 90% e' di eta' inferiore ai 40 anni (Promed 20060211.0463). Le ragioni di questa distribuzione in relazione all'eta' (rischio di contagio, documentazione della malattia non obbiettiva, problemi intrinsici dell'ospite etc.) sono poco chiare. Ugualmente, non e' noto se, e fino a quale punto, la composizione genetica gioca un ruolo nella suscettibilita' e nella resistenza all'infezione da virus influenzale H5N1(Promed 20060216.0512).

E' previsto che la prossima pandemia causi malattia in 2 miliardi di persone. Proiezioni derivate da simulazioni ottimiste, modellate sulla pandemia mite del 1968, prevedono tra i 2 milioni e il 7.4 milioni di casi (WHO 2005b). Tuttavia, se trasferiamo la mortalita' associata al virus influenzale del 1918 alla popolazione mondiale attuale, ci potrebbero essere tra il 180 milioni e i 360 milioni di decessi nel mondo (Osterholm 2005).

Impatto individuale

Il destino di un individuo durante un'epidemia o una pandemia influenzale, e' variabile. Si stima che circa la meta' degli individui infetti non avranno sintomi clinici. Tra gli altri, i sintomi variano da sintomi respiratori con febbre simili a un raffreddore comune, a malattie febbrili che variano da mite a estenuante (Hoffmann 2006a), e che possono causare infermita' in polmoni, cuore, cervello, fegato, reni, e muscolatura (Nicholson 2003).

Il decorso clinico e' influenzato dall'eta' del paziente, dal grado di immunita' preesistente, dalle proprieta' del virus, dal fatto che il paziente sia o no un fumatore, da morbidita' coesistenti, da immunosoppressione, e da gravidanza (Nicholson 2003). La morte e' spesso causata da polmonite virale primaria o da infezioni respiratorie batteriche secondarie, specialmente in pazienti con malattie polmonari o cardiopolmonari preesistemti. I molto giovani e gli anziani sono comunemente piu' a rischio di sviluppare complicazioni gravi; tuttavia, durante una pandemia, c'e' uno spostamento della mortalita' verso fasce d'eta' piu' giovani (Simonson 1998).

Negli esseri umani, la riproduzione di sottotipi influenzali sembra limitata alle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio. Il virus che penetra in una cellula causa effetti citopatici complessi, prevalentemente in cellule dell'epitelio colonnare, in quanto termina la sintesi proteica dell'ospite. La perdita di proteine cellulari essenziali provoca morte cellulare da necrosi (Yuen 2005). Ci sono numerosi fattori individuali associati con la protezione o che aumentano il rischio di un esito fatale causato da un tipo particolare di influenza (Behrens and Stoll 2006), ed e' possibile che fattori genetici influenzino la suscettibilita'. L'immunita' specifica verso certi epitopi virali o un certo grado di immunita' incrociata possono spiegare perche' persone di eta' superiore ai 65 anni siano state meno colpite dalla pandemia del 1918. Non e' noto se meccanismi simili siano in gioco nella strana distribuzione di eta' nell'epidemia corrente dell'influenza aviaria H5N1 (ProMED 20060211.0463).

L'inusuale gravita' delle infezioni umane con virus H5N1 e' stata inizialmente attribuita alla presenza di parecchi amminoacidi basici adiacenti al sito di scissione, una caratteristica classica dei virus aviari dell'influenza A altamente patogenici (Subbarao 1998). La presenza di questi amminoacidi basici rende la proteina suscettibile alle proteasi di molti tipi di tessuto e di conseguenza ne permetterebbe la diffusione extrapolmonare a causa di un ampliamento del tropismo nei tessuti (Yuen 2005). Un'altra spiegazione potrebbe essere la capacita' di H5N1 di interferire con i diversi tipi di interferone che sono centrali nel prevenire la diffusione virale al di fuori del tratto respiratorio fermando cosi' una delle difese immunitarie innate specifiche contro le infezioni virale. E' stato dimostrato che il gene non strutturale (NS) dei virus H5N1 altamente patogenici conferisce resistenza agli effetti antivirali degli interferoni e del fattore necrotico tumorale alfa (TNFα) (Seo 2002). I virus H5N1sembrano essere capaci di indurre una trascrizione dei geni che codificano per le citochine pro-infiammatorie superiore a quella indotta dai virus H3N2 o H1N1, e la piu' importante di queste e' il TNF alfa (Cheung 2002). Questi meccanismi possono eventualmente causare decesso da sindrome da citochine (Peiris 2004).

Durante epidemie influenzali interpandemiche, il recupero da influenza interpandemica e' solitamente tranquillo. Tuttavia, in casi di influenza umana dovuti a H5N1 la mortalita' e' stata fino ad ora notevole (WHO 20060213). Dispnea, ARDS e danno irreparabile a vari organi sono state la caratteristica dominante dei casi fatali (Hoffmann 2006a), con un tempo medio dall'inizio della sintomatologia al decesso di 9 giorni (n=76) (http://www.influenzareport.com/links.php?id=16).

Il virus

Le malattie infettive sono il risultato di un conflitto di interesse tra macroorganismi e microorganismi. Su questo pianeta non siamo soli.

Necessita' per il successo

Per diventare pandemico, un virus influenzale deve possedere una serie di caratteristiche. Deve

- Entrare nel corpo umano ed essere in grado di replicarsi
- Causare malattia negli esseri umani, e
- Essere di facile trasmissibilita' tra persone.

Idealmente, deve essere piu' patogenico di altri ceppi di influenza che sono in competizione. Nella situazione attuale, un virus con potenzialita' pandemica si troverebbe a competere con i ceppi circolanti H3N2 e H1N1.

Il prerequisito per il successo e' un buon adattamento: adattamento alle cellule umane; capacita' di prevalere sull'apparato produttivo della cellula dell'ospite per produrre progenie; cosi' come la capacita' di indurre nell'individuo infetto starnuti e tosse che possono distribuire e diffondere la progenie.

Essenziali per il successo sono la virulenza (Noah 2005, Obenauer 2006, Salomon 2006) – e la novita': se il virus e' un vero nuovo arrivato, la maggior parte degli esseri umani avranno poca o nessuna protezione. Il nuovo virus avra' accesso illimitato a ipoteticamente ogni essere umano e avra' a disposizione un terreno di coltura di piu' di 6.5 miliardi di esseri umani. E questa e' una delle biomasse piu' estese nel mondo.

Il passaggio dei poteri fra il regno di un sottotipo di influenza a uno nuovo e' chiamato "antigenic shift" (spostamento antigenico) perche' le caratteristiche antigeniche del nuovo virus devono cambiare in modo drammatico per evitare, teoricamente, il sistema immunitario di tutto il genere umano. Antigenic shift e' un cambio sostanziale nei virus A dell'influenza che risulta in nuova emagglutinina e/o nuove neuroaminidasi. Questo cambio puo' accadere a causa di: 1) riassortimento del genoma segmentato di due virus progenitori, o 2) mutazione graduale di un virus animale. Perche' avvenga il riassortimento, sia il nuovo virus candidato per la pandemia, solitamente di origine aviaria, che un virus umano gia' in circolazioine, i.e. H3N2 o H1N1, devono infettare la stessa cellula dell'ospite umano. All'interno della cellula, geni da entrambi i virus vengono riassortiti in un virus interamente nuovo. Questo e' cio' che accadde nel 1957 e nel 1968 (Figura 2).

La via del riassortimento puo' non essere la migliore per un virus candidato a generare una pandemia. Dati recenti ottenuti da virus ricombinanti che contenevano geni del virus pandemico del 1918 mostrano che virus che esprimono uno o piu' geni del virus del 1918 sono meno virulenti rispetto a quelli che esprimono la costellazione di tutti e otto i geni collettivamente (Tumpey 2005). Il virus del 1918 fu sicuramente particolare: sembra che non fu il risultato di un riassortimento fra due virus esistenti, ma un virus esclusivamente aviario che si adatto' agli esseri umani attraverso mutazioni discrete (Taubenberger 2005).

E’ ovvia la tentazione di speculare che l’emergenza di un virus influenzale aviario completamente adattato agli esseri umani nel 1918 (n=1) possa essere piu’ letale dell’arrivo di virus riassortiti nel 1957 e 1968 (n=2), ma una speculazione di questo tipo non ha basi scientifiche. E’ interessante – e preoccupante – notare che certi cambi di amminoacidi presenti nel virus del 1918 che lo distinguono dalle sequenze aviarie standard sono presenti anche nel virus aviario altamente patogenico di tipo H5N1, il che suggerisce che questi cambi potrebbero facililtare la riproduzione del virus nelle cellule umane e aumentarne la patogenicita’ (Taubenberger 2005).

Virologia

I virus A e B dell’influenza sono virus ricoperti da membrane, con genoma segmentato costituito da otto segmenti di RNA a singola elica non codificanti (negative strand) composti da 890 – 2341 nucleotidi (Gürtler 2006). La loro struttura e’ sferica o filamentosa, e varia fra gli 80 e i 120 nm in diametro (figure 4 e 5). In sezioni trasversali, i virioni dei virus dell’influenza somigliano a una pizza simmetrica con una fetta di salame al centro e sette altre fette distribuite equitariamente alla perifieria (Noda 2006). In base all’antigenicita’ delle glicoproteine di superficie, emagglutinina (HA) e neuraminidase (NA), i virus A dell’influenza sono ulteriormente divisi in sedici H (H1-H16 [Fouchier 2005]) e nove N (N1-N9) sottotipi. HA e’ l’antigene piu’ importante per l’azione di anticorpi neutralizzanti, ed e’ coinvolto nel legame del virus a recettori presenti sulla cellula ospite. NA e’ coinvolto nel rilascio della progenie virale dalla superficie cellulare. Al momento, solo virus di tipo H1N1 e H3N2 sono in circolazione fra popolazioni umane.

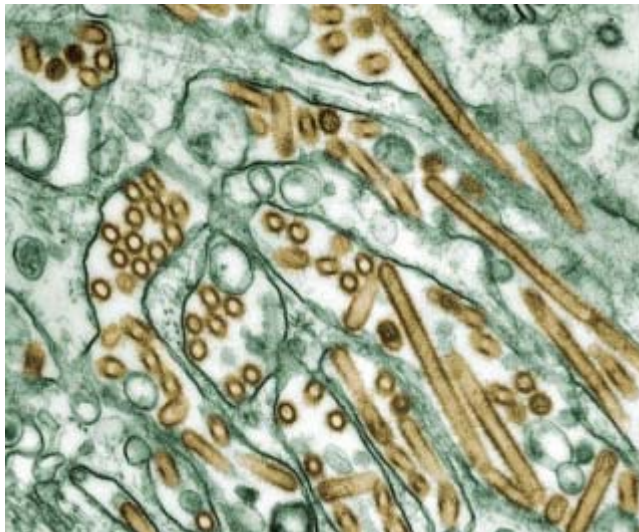



Figura 4. Elettromicrografia colorata di virus A dell’influenza aviaria H5N1 (color oro) coltivati in cellule NDCK (verde). Riprodotta con permesso da CDC/ Cynthia Goldsmith, Jacqueline Katz, and Sharif R. Zaki, Public Health Image Library, http://phil.cdc.gov/Phil/home.asp

Riserve naturali e sopravvivenza

I virus A dell'influenza sono in grado di infettare una grande varieta' di specie, soprattutto uccelli, e tra questi soprattutto uccelli acquatici, in cui l'infezione e' nella maggior parte dei casi intestinale, trasmessa attraverso acqua contaminata, e asintomatica. L'anatra domestica nel Sud Est asiatico e' l'ospite principale dei virus A dell'influenza e ha anche un ruolo fondamentale nel mantenimento e nella generazione del virus H5N1 (Li 2004).

In Tailandia, c'e' stata una forte associazione tra il virus H5N1 e l'abbondanza di anatre in libera circolazione e, anche se in quantita' minore, di polli e galli autoctoni, cosi' come di zone umide, ed esseri umani. Terreni usualmente allagati che vengono usati per la doppia produzione di riso, in cui anatre pascolano liberamente durante tutto l'anno sembrano essere un fattore fondamentale per il mantenimento e la diffusione di HPAI (Gilbert 2006).

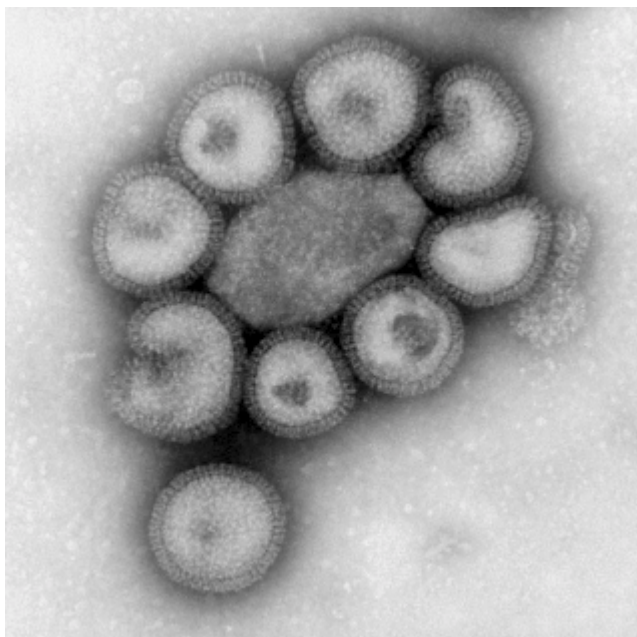



Figura 5. Questa elettromicrografia (TEM) con colorazione negativa mostra i dettagli ultrastrutturali di una serie di virioni. Con permesso: CDC/ Dr. F. A. Murphy, Public Health Image Library, http://phil.cdc.gov/Phil/home.asp

Virus aviari altamente patogenici possono sopravvivere nell'ambiente per lunghi periodi specialmente a basse temperature (ad esempio in acque contaminate da letame). In ambiente acquatico, il virus puo' sopravvivere fino a quattro giorni se la temperatura e' di 22°C e piu' di 30 giorni a 0°C. In materiale congelato, il virus probabilmente puo' sopravvivere all'infinito. Studi condotti di recente indicano che virus H5N1 isolati nel 2004 sono diventati piu' stabili e sono in grado di sopravvivere a 37°C per sei giorni – isolati dell'epidemia del 1997 erano in grado di sopravvivere per soli 2 giorni (WHO 20041029). Il virus e' distrutto da alte

temperature (56°C per 3 ore o 60°C per 30 minuti) e da disinfettanti comuni, come formalina e composti a base di iodio.

Trasmissione

L'influenza e' trasmessa principalmente da persona a persona attraverso gocce (di diametro >5 µm) provenienti dalle cavita' nasali o dalla gola di una persona infetta che tossisce o starnutisce (Figura 6). Le particelle non rimangono sospese nell'aria, ed e' indispensabile uno stretto contatto (fino a 1-2 metri) perche' ci sia trasmissione del virus. La trasmissione puo' occorrere anche attraverso contatto epidermico o attraverso contatto indiretto con secrezioni dell'apparato respiratorio (toccando occhi, naso o bocca dopo avere toccato superfici contaminate). Individui adulti possono diffondere il virus dell'influenza da due giorni prima a circa cinque giorni dopo l'apparenza di sintomi. I bambini possono diffondere il virus per 10 giorni o per periodi piu' lunghi.

Figura 6. Uno sternuto non bloccato rilascia goccie che contengono da due a cinquemila batteri. Image copyright by Prof. Andrew Davidhazy, Rochester Institute of Technology. Used with permission. (http://www.rit.edu/~andpph)

I virus dell'influenza sono usualmente altamente specie specifici e solo raramente causano infezione in altre specie. Questo e' dovuto a differenze nell'uso di recettori cellulari. I virus dell'influenza aviaria usano come recettori glicoproteine della superficie cellulare che contengono resudui sialyl-galactosyl legati da un legame 2-3, mentre i virus umani si legano a recettori che contengono meta' sialyl-galactosyl legate in posizione terminale 2-6. Per far si' che un virus aviario possa essere facilmente trasmesso tra individui, e' necessario che acquisti la capacita' di legarsi a cellule che presentano i recettori 2-6 in modo da poter accedere al citoplasma e replicarsi.

Anche se e' noto che singole sostituzioni amminoacidiche possono alterare drasticamente la specificita' per il recettore nei virus aviari H5N1 (Gambaryan 2006), per il momento non sono note le mutazioni che sono necessarie per fare che il virus H5N1 sia trasmissibile con facilita' e continuamente fra individui, ma e'

noto che esistono vie di trasmissione in cui H5N1 puo' mutare e acquisire specificita' per le cellule umane (Stevens 2006).

Sin dal 1959, le infezioni umane causate da virus aviari si sono verificate solo raramente. Delle centinaia di ceppi di virus A dell'influenza aviaria, solamente quattro sono conosciuti per aver causato infezioni in esseri umani: H5N1, H7N3, H7N7, e H9N2 (WHO 200601). Con l'esclusione di H5N1, l'infezione umana ha causato generalmente sintomi leggeri e raramente malattia grave (Du Ry van Beest Holle 2003, Koopmans 2004). Per il virus H5N1, la sorgente principale delle infezioni umane sembra essere uno stretto contatto con uccelli malati o morti (come avviene durante l'uccisione, lo spiumamento, e la preparazione) o esposizione a feci di pollame in luoghi di gioco e ricreazione (WHO 200601).

H5N1: Come sta progredendo

Al momento, l'infezione umana col virus H5N1 e' relativamente rara, anche se ci deve essere stata notevole esposizione al virus per via di pollame infetto. Questa e' un'indicazione che la barriera fra le specie per l'acquisizione di questo virus aviario e' ancora abbastanza alta per il tipo H5N1 – nonostante sia stato in circolazione per quasi 10 anni. Tuttavia sembra che, recentemente, i ceppi H5N1 siano diventati piu' patogenici e che abbiano esteso il loro raggio di azione:

- Il ceppo H5N1 continua ad evolvere (Li 2004), e certi cloni hanno ampliato le loro capacita' di legame in modi che possono rispecchiare un certo grado di adattamento per l'ospite umano (Le 2005). H5N1 ha non solo espanso la sua capacita' di infettare diverse specie aviarie (Perkins 2002), ma anche mammiferi, e puo' infettare in natura esseri umani, tigri, leopardi, gatti domestici e foine (Keawcharoen 2004, Thanawongnuwech 2005, Amonsin 2006).
- Il virus H5N1 ha aumentato le sue caratteristiche patogeniche in topi e furetti (Zitzow 2002, Govorkova 2004).
- E' stato dimostrato recentemente che le anatre sono in grado di rilasciare nelle secrezioni ceppi di H5N1 altamente patogenici fino a 17 giorni post-infezione (Hulse Post 2005).
- Nelle regioni centrali della Cina, piu' di 6,000 uccelli migratori sono morti nella riserva naturale del Qinghai Lake nell' Aprile del 2005. Prima di quell'avvenimento, era altamente inusuale che uccelli selvatici morissero a causa di influenza aviaria altamente patogenica (WHO 20050818).
- Virus provenienti da localita' molto diverse (Qinghai Lake, Nigeria, Iraq, Turchia, Russia, Kazakhstan, e Mongolia) mostrano una distinta mutazione che e' associata con maggiore fatalita' in uccelli e topi. Tale stabilita' genetica in un periodo di molti mesi e' inusuale ed e' possibile ipotizzare che il virus – nella sua forma altamente patogenica – si sia adattato ad almeno certe specie di uccello acquatico migratorio e che sia in co-esistenza in questi uccelli in uno stato di equilibrio evoluzionario che non sembra causare danno, ma che viaggia con questi uccelli lungo le loro rotte migratorie (WHO 20060220).

- In uno studio che non e' stato pubblicato, condotto in Tailandia centrale, in 160 su 629 cani erano presenti anticorpi contro H5N1 (Butler 2006).
- I gatti domestici sono normalmente considerati resistenti all' influenza. Tuttavia, quando alimentati con polli infetti con il virus H5N1, i gatti presentarono malattia grave e furono in grado di trasmettere la malattia ad altri gatti (Kuiken 2004). I gatti possono secernere virus non solo attraverso il sistema respiratorio ma anche tramite l'apparato digerente (Rimmelzwaan 2006), il che suggerisce che ci sia la possibilita' di nuove vie di contagio tra e fra mammiferi. Nel febbraio 2006, H5N1 venne trovato in un gatto domestico (WHO 20060228) e in una faina (WHO 20060309) nell'isola tedesca di Ruegen in cui, due settimane prima, piu' di 100 uccelli selvatici furono trovati morti.
- Isolati umani di H5N1 nel 2003 e 2004 mostrarono un grado di virulenza in furetti sostanzialmente maggiore di altri virus H5N1 isolati da esseri umani dal 1997 (Maines 2005).

Gestione individuale

Cerca di non contrarre il virus, e se sei contagiato, cerca di risolvere l'infezione. Nella gestione dell' influenza, questo breve consiglio di saggezza medica puo' essere tradotto come: 1) tre linee di difesa basate sulla profilassi (profilassi all'esposizione, vaccinazione, uso profilattico di farmaci antivirali); e 2) una linea di difesa basata sul trattamento con farmaci (antivirali). A causa della natura delle infezioni influenzali – gli individui infetti possono essere contagiosi per 24-48 ore prima di mostrare sintomi – la profilassi all'esposizione e' praticamente impossibile durante una pandemia o un'epidemia, soprattutto nel nostro mondo sovrappopolato e altamente mobile.

Profilassi in caso di epidemia

Profilassi all'esposizione

Misure di igene personale di livello minimo, inventate piu' di un secolo fa, sono ancora la pietra miliare della profilassi. I medici devono incoraggiare il lavaggio regolare delle mani tra i famigliari di pazienti. In generale, le persone dovrebbero essere consigliate di evitare di toccare occhi, naso o bocca. E' consigliabile ridurre l'impatto di starnuti e colpi di tosse usando tutti i mezzi a disposizione (WHO 2006a).

Vaccinazione

La vaccinazione antinfluenzale e' il secondo pilastro nella prevenzione dell'influenza. Si consiglia di iniziare la vaccinazione nell'emisfero nord in ottobre. Le raccomandazioni riguardo la composizione del vaccino sono rilasciate ogni anno sulla base di ricerche dettagliate sui ceppi circolanti. La vaccinazione contro il tipo di virus dell'influenza che si rivela prevalente e' consigliata per tutti gli individui in gruppi ad alto rischio, inclusi individui di eta' uguale o superiore ai 65 anni (CDC 2005), e coloro che soffrono di malattie croniche, in particolare diabete, malattie

croniche dell'apparato respiratorio e cardiopatie, e persone immunocompromesse a causa di malattia o di terapia concomitante. Oltretutto si raccomanda che tutto il personale medico e paramedico sia vaccinato annualmente contro l'influenza (CDC 2006b).. L'incidenza della vaccinazione contro l'influenza dipende da un numero di variabili che includono la raccomandazione del medico curante e la copertura offerta dai media (Ma 2006).

In adulti di sana costituzione che sono stati esposti al virus, l'efficacia del vaccino dopo una dose puo' raggiungere l'80-100%, mentre in adulti che non sono mai stati esposti (coloro che ricevono l'immunizzazione contro l'influenza per la prima volta), e' possibile raggiungere lo stesso grado di efficacia dopo due dosi. In individui che soffrono a causa di malattie concomitanti (HIV, infezione, cancro, trasplanto renale), l'efficacia e' minore (Korsman 2006); tuttavia la protezione dipende fondamentalmente dalla persona vaccinata e dalla concordanza del vaccino con il virus circolante (Wong 2005).

L'efficacia e l'effettivita' dei vaccini contro l'influenza in individui di eta' uguale o superiore ai 65 anni e' stata analizzata di recente. Vaccini ad altamente concordanti con il virus circolante sono in grado di prevenire ospitalizzazione, polmonite, malattie respiratorie, cardiopatie, e decesso. L'effettivita' negli anziani e' maggiore per individui che vivono in casa di riposo in confronto a coloro che vivono all'interno della comunita' (Jefferson 2005). Il vaccino inattivato riduce complicazioni in pazienti con malattie croniche ostruttive dell'apparato respiratorio (Poole 2006). I vaccini contro l'influenza sono efficaci in bambini di eta' superiore ai due anni, ma pochi dati sono disponibili per bambini di eta' inferiore ai due anni (Smith 2006). Spray nasali di vaccino vivo sembrano migliori nel prevenire l'influenza in confronto a vaccini inattivati.

Farmaci antivirali

In certe popolazioni, i farmaci antivirali possono rivelarsi un'opzione utile per coloro che non sono protetti dalla vaccinazione. Bisogna sottolineare, tuttavia, che l'uso profilattico di farmaci antivirali non e' mai un sostitutivo della vaccinazione annuale consigliata dai servizi per la salute nazionali.

I candidati per l'uso profilattico a breve durata dei farmaci antivirali sono pazienti ad alto rischio che vengono vaccinati solamente dopo l'inizio di un'epidemia, cosi' come i contatti ad alto rischio di un individuo con influenza. In certi casi, la profilassi potrebbe venire consigliata quando un'epidemia e' causata da un ceppo che non e' rappresentato nel vaccino. Per ulteriori dettagli vedere Hoffmann 2006b.

Delle due classi di antivirali a disposizione, gli adamantani (amantadina, rimantadina) sono stati sottoposti rcentemente ad intensa discussione dal momento che e' stato notato che la prevalenza globale di virus resistenti agli adamantani e' aumentata in maniera significativa: dallo 0.4% nel 1994-1995 al 12% nel 2003-2004 (Bright 2005). E' possibile che l'aumento della resistenza in Cina sia dovuto ad un aumento dell'uso di adamantina venduta come medicinale da banco avvenuto in seguito all'emergenza della sindrome acuta respiratoria severa (SARS) (Hayden 2006). Negli Stati Uniti, 109/120 (91%) dei virus A dell'influenza (H3N2) isolati durante la stagione 2005-06 fino al 12 gennaio 2006, contenevano un cambio in un amminoacido in posizione 31 della proteina M2, che conferisce resistenza a

amantidina e rimantidina (CDC 2006, Bright 2006). Sulla base di questi risultati, il CDC (Center for Disease Control negli Stati Uniti) ha rilasciato una raccomandazione ad interim che ha impedito l'uso di amantidina e rimantidina per il trattamento o la profilassi dell'influenza A negli Stati Uniti per il resto della stagione influenzale 2005-2006. Durante questo periodo i farmaci consigliati in caso di terapia e profilassi dell'influenza sono stati oseltamivir o zanamivir.

Trattamento delle epidemie

In casi senza complicazioni, il riposo a letto con adeguata idratazione e' il trattamento migliore per la maggior parte di pazienti adolescenti e giovani (Hoffmann 2006b). Il trattamento con antibiotici deve essere riservato per i casi di polmonite secondaria batterica.

I farmaci piu' vecchi, amantadina e rimantadina, sono efficaci solo contro i virus A dell'influenza (CDC 2005). Bisogna notare che: ci sono pochi dati a disposizione sull'uso negli individui piu' anziani; i farmaci hanno piu' effetti collaterali; e nella stagione 2005-2006 il CDC **ha sconsigliato l'uso di questi farmaci** (vedi sezione precedente). Se la rimantidina e l'amantidina rimangono in uso, e' importante agire in modo da ridurre l'emergenza di virus resistenti a farmaci antivirali. Il trattamento con amantidina o rimantidina dovra' dunque essere sospeso il piu' presto possibile, normalmente dopo 3-5 giorni di terapia, o nelle 24-48 ore seguenti alla scomparsa dei sintomi (CDC 2005).

I nuovi farmaci inibitori delle neuraminidasi sono permessi nella terapia di pazienti di eta' uguale o superiore ad 1 anno (oseltamivir) o uguale o superiore a 7 anni (zenamivir). Questi farmaci sono indicati per pazienti con malattia acuta senza complicazioni che presentano sintomi da non piu' di due giorni. La durata della terapia per entrambi i farmaci e' 5 giorni.

Profilassi delle pandemie

Il problema associato all'emergenza di un nuovo ceppo pandemico di virus dell'influenza e' che non c'e' luogo sulla faccia della terra in cui sia possibile nascondersi. In teoria ogni singolo essere umano sara' ad un certo punto contagiato con il nuovo virus, sia che esso sia un senza tetto parigino o il presidente di un potente stato occidentale. Se non sarai infettato nella prima ondata dell'epidemia, lo sarai probabilmente durante la seconda. E se questo non succedera' durante la seconda ondata, succedera' durante una delle future epidemie. Se un nuovo ceppo pandemico di influenza prevale come la maggior causa di influenza negli esseri umani, bisogna che tutti sviluppino una risposta anticorpale protettiva contro il virus – per il semplice fatto che e' sicuro che il virus sara' con noi per molti anni. Gli anticorpi conferiranno un certo grado di protezione contro nuovi ceppi di influenza, ma per sviluppare anticorpi bisogna essere stati contagiati o vaccinati.

Per la stragrande maggioranza dei 6.5 miliardi degli esseri umani viventi, non ci sara' un vaccino a disposizione all'inizio della nuova pandemia. Dal momento in cui sara' dimostrato che il virus puo' essere efficacemente trassmesso tra esseri umani, passeranno circa 6 mesi prima che un vaccino possa essere prodotto. Di conseguenza, la quantita' di vaccino a disposizione sara' particolarmente inadeguata, e ci vorranno anni per produrre vaccini in sufficenza per 6.5 miliardi di persone. In piu', le competenze per la produzione sono concentrate in Australia,

Canada, Francia, Germania, Italia, Giappone, Olanda, Regno Unito e Stati Uniti, ed e' molto probabile che la distribuzione del vaccino venga controllata dalle nazioni produttrici (Fedson 2005). E' facile di conseguenza immaginare chi sara' servito prima.

E' di conseguenza ragionabile assumere che la stragrande maggioranza delle persone esistenti non avranno accesso ne' al vaccino ne' a farmaci antivirali per molti, molti mesi. Senza vaccino o con un vaccino distribuito tardi, e' possibile che individui possano avere bisogno di strategie alternative per affrontare la pandemia. Fronteggiarla o evitarla – questa sara' la questione nella mente di molti.

Il limitarsi ad affrontare il nuovo virus pandemico sperando in un buon esito, non risolve il problema della misurazione dei tempi. Infatti, non c'e' evidenza uniforme su qual'e' il momento migliore per diventare infetti:

- Nell'epidemia del 1918, la prima ondata che ebbe luogo nei mesi primaverili, fu meno letale della seconda ondata autunnale (Barry 2004). E' ragionevole credere che le persone contagiate durante la prima ondata abbiano avuto una sorta di protezione durante la seconda ondata. Questo andrebbe a favore dell'idea che e' ideale confrontare il nouvo ceppo influenzale il piu' presto possibile.
- Tuttavia, dati piu' dettagliati sulla seconda ondata nel 1918, suggeriscono il contrario: chi si ammalo' tardi durante la seconda ondata, ebbe minor probabilita' di morire e un decorso della malattia lieve (Barry 2004). Citta' colpite tardi soffrirono generalmente meno, e individui nelle specifiche citta' soffrirono meno se vennero colpiti dal virus tardi. Di conseguenza, le citta' americane della costa occidentale, colpite tardi, ebbero minore mortalita' delle citta' della costa orientale; e l'Australia, che non fu colpita dalla seconda ondata fino al 1919, ebbe la piu' bassa mortalita' di tutte le nazioni sviluppate (Barry 2004).

Un fenomeno che si osserva abitualmente nelle malattie infettive e' che gli organismi patogeni diventano meno virulenti man mano che evolvono nella popolazione umana. Questo favorirebbe la seconda opzione e cioe' che e' meglio evitare un nuovo virus influenzale il piu' a lungo possibile. Un vantaggio in piu' nel fare questa scelta e' che parecchi mesi dopo l'inizio della pandemia, il caos iniziale che il sistema sanitario dovra' inevitabilmente affrontare, sara' se non altro in parte risolto.

La scelta piu' estrema nel tentativo di evitare l'influenza sarebbe quella di scappare in aree remote del globo – un villaggio di montagna in Corsica, il deserto Libico, o le isole Samoa in America (Barry 2004). Questa soluzione potrebbe funzionare, ma potrebbe anche non funzionare. Se il confronto diretto e non protetto con il nuovo virus diventa inevitabile e' ancora possibile avere un certo grado di protezione: mascherine per il viso (ma: ci saranno mascherine disponibili ovunque? E per quanto tempo?) e distacco dai rapporti sociali (non presentarsi per riunioni, stare a casa il piu' possible) – ma come si puo' se si e' ad esempio cassieri ad un affollato supermercato parigino; o se si e' conduttori della metropolitana a Londra; o se si e' impiegati all'ufficio postale di Berlino? Da dove puo' arrivare il denaro necessario

se non si va al lavoro per mesi? Ci si puo' ritrarre dal mondo? Ci si puo' ritrarre dalla vita?

Trattamento delle pandemie

Non sappiamo se il nuovo ceppo pandemico dell'influenza sara' suscettibile ai medicinali antivirali disponibili al momento. Se sara' causato da un virus H5N1, gli inibitori delle neuraminidasi oseltamivir e zanamivir potrebbero rivelarsi fondamentali nel pianificare per una pandemia (Moscona 2005). Bisogna pero' ricordare che la maggior parte degli individui nel mondo non avranno accesso a questi farmaci. Essi sono poco disponibili e non e' facile aumentarne la produzione. Perfino in paesi che hanno accumulato oseltamivir, la distribuzione di un farmaco poco disponibile creera' considerabili problemi di tipo etico nel trattamento di pazienti. In certi paesi con pronunciate disparita' di ricchezza (ad esempio certe nazioni dell'Africa o dell'America Latina; gli Stati Uniti), e' possibile prevedere fermenti sociali.

L'esperienza nel trattamento della malattia da H5N1 negli esseri umani e' limitata e i referti clinici pubblicati fino ad ora includono troppo pochi pazienti (Yuen 1998, Chan 2002, Hien 2004, Chotpitayasunondh 2005, WHO 2005, de Jong 2005). In particolare, la dose ottimale e la durata ottimale del trattamento con oseltamivir non e' certa nella malattia da H5N1, e sono state proposte le seguenti raccomandazioni (WHO 2005):

- Incominciare il trattamento con oseltamivir il piu' presto possible. Dal momento che infezioni con H5N1 continuano a presentare un elevato livello di mortalita', bisogna considerare il trattamento fino ad 8 giorni dal presentarsi dei sintomi, se c'e' evidenza di continuata replicazione virale (WHO 2005, de Jong 2005)
- E'possibile considerare di aumentare la dose di oseltamivir in malattia grave (150mg due volte al giorno in adulti) e di continuare il trattamento per periodi prolungati (7-10 giorni o piu' a lungo) (WHO 2006d).

Gestione a livello globale

La gestione dell'influenza in caso di scoppio improvviso e' ben definita per le epidemie e meno chiara per le pandemie.

Gestione delle epidemie

Il punto fondamentale dell'intervento medico negli **anni interpandemici** e' la vaccinazione (vedi il sommario in CDC 2005). Con il costante cambiamento del virus dell'influenza, e' necessario riesaminare la formulazione del vaccino annualmente. La produzione di vaccini e' una procedura ben stabilita: durante l'anno, centri di sorveglianza dell'influenza in 82 nazioni nel mondo controllano i ceppi circolanti dell'influenza e ne osservano le tendenze. Successivamente il WHO determina quail sono i ceppi che piu' probabilmente somiglieranno ai ceppi in circolazione durante la prossima stagione invernale, e i produttori di vaccino ne iniziano la produzione. La decisione sulla formulazione del nuovo cocktail viene presa ogni anno in febbraio per l'inverno successivo nell'emisfero nord (WHO 2006b)e in settembre per l'inverno successivo nell'emisfero sud (per maggiori dettagli Korsman 2006 e la figura in http://influenzareport.com/link.php?id=15). Non e' facile prevedere i cambiamenti dell'emoagglutinina virale e non sempre e' possible prevederli con successo. In anni in cui il ceppo previsto non e' concordante con il ceppo presente nel mondo reale, la protezione da vaccino contro l'influenza puo' essere non superiore al 30%.

Gestione delle pandemie

- Vedi anche Reyes-Terán 2006 e WHO 2006c –

Pandemie influenzali serie sono eventi rari e imprevedibili. La gestione di situazioni nuove richiede una conoscenza della magnitudine dei problemi nel futuro. L'impatto sulla salute umana puo' rivelarsi estremamente variabile ed e' espresso in termini numerici di

- Individui infetti
- Individui che presentano malattia clinica
- Pazienti ospitalizzati
- Decessi.

Di norma si assume che durante il primo anno della prossima pandemia 2 miliardi di persone saranno contagiate con il nuovo virus e che la meta' presentera' sintomi. Le previsioni sul numero di pazienti per cui sara' necessaria ospitalizzazione e sul numero di decessi sono meno accurate. Durante le pandemie del 1957 e 1968, la mortalita' in eccesso e' stata valutata a circa un milione di decessi per entrambi i casi. Contrariamente, si pensa che 50 milioni di persone siano morte a causa della pandemia influenzale del 1918. L'eccesso di mortalita' durante le ultime pandemie influenzali vario' da 26 a 2,777 im 100,000 persone (Tavola 2). Se si rettifica tenendo in considerazione la popolazione mondiale odierna, questi numeri diventano da 1.7 milioni a 180 milioni di decessi.

Tavola 2: Mortalita' nelle pandemie del XX secolo e proiezioni per la prossima pandemia *

	Popolazione	Decessi	per 100,000 persone
1918	1.8 miliardi	50 milioni	2,777
1957	3.8 miliardi	1 milione	26
1968	4.5 miliardi	1 milione	27
Next	6.5 miliardi	1.7 milione	26
Next	6.5 miliardi	180 milione	2,777

Dati tratti da http://www.census.gov/ipc/www/world.html +

http://www.prb.org/Content/NavigationMenu/PRB/Educators/Human_Population/Population_Growth/Population_Growth.htm

In nazioni come Francia, Spagna e Germania, la mortalita' annuale da tutte le cause e' di circa 900 decessi ogni 100,000 individui. Una pandemia devastante potrebbe di conseguenza, nel corso di pochi mesi, causare tre volte tanti decessi di quanti occorrebbero normalmente in un anno intero. Infatti, distruzione sociale ed economica sara' presente in ogni nazione con una certa variabilita'. In un mondo in cui i mass media reportano eventi catastrofici estensivamente, l'atmosfera che risulterebbe potrebbe essere simile a quella di uno scenario bellico. Contrariamente, una pandemia lieve simile a quella del 1968 potrebbe passare quasi inosservata e senza causare impatto considervole nel sistema sanitario nazionale e nell'economia globale.

La preoccupazione che il mondo potrebbe dover affrontare un revival dello scenario del 1918 e' fondata sull'osservazione che il virus H5N1 che sta circolando al momento ha in comune caratteristiche inquietanti con il virus pandemico del 1918 (Taubenberger 2005). tuttavia, se H5N1 e' il virus candidato per la prossima pandemia influenzale devastante, perche' non ha ancora acquisito la capacita' di passare facilmente da essere umano ad essere umano? Durante gli anni scorsi, H5N1 ha avuto sia il tempo che l'opportunita' di mutare in un ceppo pandemico. Perche' non e' successo? E se non e' successo in quasi dieci anni, perche' dovrebbe succedere in futuro? E' vero che dei 16 sottotipi di influenza H, solo tre (H1, H2 e H3) sono noti per aver causato pandemie umane (1918, 1957, 19168 e probabilmente 1989), ed e' stato persino ipotetizzato che i virus H5 hanno un'inerente incapacita' di essere trasmessi efficentemente tra esseri umani. Scopriremo forse un giorno che i virus H5 non sono in grado di causare pandemie umane, perche' non tutti i sottotipi possibili possono riassortirsi per formare ceppi pandemici per l'umanita'? Questo non possiamo saperlo.

Se si escludono mutazioni singole che possono gradualmente trasformare un virus influenzale aviario in un virus umano, il riassortimento e' l'altro modo in cui nuovi virus pandemici umani possono essere generati. Le due pandemie che vennero scatenate da questo fenomeno, occorrero nel 1957 e nel 1968. Entrambe furono relativamente lievi e fondamentalmente diverse da cio' che accadde nel 1918. C'e' qualche evidenza preliminare a livello sperimentale che indica che i virus riassortiti del 1918 furono singolarmente meno virulenti in confronto all'espressione coordinata di tutti e otto i genomi (Tumpey 2005). Possiamo quindi dedurre che pandemie risultanti da eventi di riassortimento fra virus umani e aviari sono piu' lievi di pandemie causate da un virus che accumula mutazioni lentamente per poter migrare dall'ospite uccello acquatico all'ospite umano? Questo non lo sappiamo.

Potrebbe anche essere il caso che un revival della catastrofe del 1918 non accada mai. Ma la pandemia del 1918 ci fu, e una buona pianificazione significa essere preparati per il peggio. Cosi' come e' impossibile prevedere se la prossima pandemia risultera' in ~20 o ~2,000 decessi per 100,000 individui, e' necessario che la comunita' internazionale si prepari per 2,000 decessi. Le tre linee di difesa sono contenimento, farmaci e vaccini.

Contenimento

Si stima che sia possible il contenimento e l'eliminazione di un ceppo influenzale pandemico emergente nel momento della sua origine tramite la combinazione di profilassi antivirale e misure di distanza sociale (Ferguson 2005, Longini 2005). A questo proposito, il WHO ha recentemente incominciato la creazione di una scorta internazionale di 3 milioni di corsi di farmaci antivirali da essere distribuiti alla zona identificata come la zona di emergenza della pandemia influenzale (WHO 20000824).

Se non e' possibile contenere la pandemia nei primi momenti della sua eruzione, un intervento rapido potrebbe almeno ritardare la diffusione a livello internazionale e far guadagnare tempo prezioso. Criteri chiave per il successo di questa strategia sono stati sviluppati. Tuttavia, la strategia ottimale per l'uso dei farmaci antiviriali in scorta non e' nota, perche' non si e' mai tentato di fermare una pandemia influenzale alla nascita.

Farmaci

Una volta che la pandemia e' iniziata – e se i vaccini non sono ancora disponibili – le risposte a livello nazionale dipenderanno sulla disponibilita' di farmaci antivirali. Dal momento che la domanda per i farmaci sara' superiore alla disponibilita', e' stato considerato come una possibile opzione per certi governi, l'approvvigionamento di tali farmaci sia sottoforma di capsule o come scorta del principio attivo in massa. Il dibattito su quale farmaco deve essere messo in scorta non e' finito. Fino a questo momento il farmaco prevalentemente usato per la formazione di scorte di inibitori delle neuraminidasi e' stato l'oseltamivir. Dopo il recente isolamento di ceppi resistenti a oseltamivir in infezioni gravi da H5N1, altri agenti antivirali a cui virus influenzali resistenti all'oseltamivir sono ancora sensibili, dovrebbero essere inclusi nell'arsenale a disposizione per il trattamentodi infezioni da virus A dell'influenza (H5N1) (de Jong 2005) – in altre parole: zanamivir.

Il valore degli adamantani nelle scorte non e' chiaro. Isolati di H5N1 ottenuti da pazienti in Cina nel 2003 e in una discendenza di virus H5N1 aviari e umani in Tailandia, Vietnam e Cambogia si sono rivelati resistenti agli adamantani (Hayden 2006). Tuttavia, isolati che sono stati esaminati da ceppi circolanti recentemente in Indonesia, Cina, Mongolia, Russia e Turchia sembrano suscettibili all' adamantina (Hayden 2005).

Per quanto riguarda l'impatto economico, c'e' evidenza che avere scorte di inibitori delle neuraminidasi, seppur costosi, potrebbe essere benefico dal punto di vista dei costi nel trattamento dei pazienti e, se sostenuto da scorte adeguate, per la profilassi a tempo breve in persone che hanno avuto contatto intimo con persone infette (Balicer 2005). Quando si confrontano le strategie che sono state adottate a Singapore in relazione alle scorte di questi farmaci per il trattamento e la

prevenzione dell'influenza, la strategia limitata al trattamento si e' rivelata quella con il beneficio economico piu' ottimale: scorte di agenti antivirali per il 40% della popolazione potrebbero salvare circa 418 vite e 414 milioni di dollari, ad un costo di 52.6 milioni di dollari per ogni ciclo di shelf-life della scorta. La profilassi si e' rivelata vantaggiosa economicamente in sottopopolazioni ad alto rischio che sono responsabili per il 78% dei decessi, e in pandemie in cui la mortalita' era > 0.6%. La profilassi in pandemie con una mortalita' del 5% nei casi di malattia, potrebbe salvare 50,000 vite e 81 miliardi di dollari (Lee 2006)..

Una volta che la pandemia incomincia, nazioni prive di scorte di antivirali non saranno probabilmente in grado di acquisire nuove scorte. In questo contesto e' stato suggerito che i governi povvedano obbligatoriamente la fornitura di licenze che consentano a produttori generici la produzione locale di farmaci antivirali, sotto la guida delle leggi locali per i brevetti, o l'importo da prodotti generici a prezzi competitivi (Lokuge 2006). In Europa certi governi stanno cercando di accumulare scorte dell'inibitore delle neuraminidasi oseltamivir per il 25% della popolazione. Il numero di dosi necessarie per ottenere questo grado di "copertura" si basa sul trattamento diurno standard di 75mg due volte al giorno (bid) per 5 giorni. Tuttavia, se dovesse essere necessario raddoppiare le dosi e la durata del trattamento (WHO 2005, WHO 2006d) per un numero sostanziale di pazienti, una scorta prevista per il 25% della popolazione potrebbe svanire molto piu' velocemente del previsto.

Per un'informazione piu' dettagliata sul trattamento dell'influenza vedere Hoffmann 2006b .

Vaccini

In un mondo ideale, 6.5 miliardi di vaccini dovrebbero essere disponibili il giorno dopo l'inizio della pandemia; cosi' come 6.5 miliardi di siringhe per inoculare il vaccino, e un numero illimitato di personale sano che lo somministri. Non viviamo in un mondo ideale. Al momento, il mondo puo' produrre circa 300 milioni di vaccini dell'influenza trivalenti ogni anno, la maggior parte dei quali e' prodotta in nove nazioni (Fedson 2005). 300 milioni di dosi trivalenti di vaccino si possono trasformare in 900 milioni di dosi monovalenti, sufficienti per vaccinare 450 milioni di persone con una vaccinazione iniziale e una dose di richiamo – questo se il vaccino H5N1 e' sufficentemente immunogenico...

Vaccini contro l'influenza sono in preparazione al momento in uova di gallina fertilizzate seguendo una procedura sviluppata piu' di 50 anni fa (Osterholm 2005). Nuove tecnologie hanno il potenziale di migliorare la potenzialita' dei vaccini (Palese 2006). Un vaccino ideale sarebbe in grado di provvedere un ampio spettro di protezione contro i sottotipi di influenza A (Neirynck 1999, Fiers 2004, De Filette 2006), ma questi vaccini sono ancora in fase sperimentale e a distanza di anni dalla produzione industriale.

Distribuzione

Quando sia farmaci che vaccini sono disponibili in quantita' limitate, le autorita' sanitarie devono decidere chi avra' accesso ai farmaci e ai vaccini. Chi dovrebbe ricevere per primo gli scarsi vaccini e antivirali: i giovani o le persone di eta' piu' avanzata (Simonsen 2004)? Se lo standard usato per misurare l'efficacia dell' intervento medico e' "numero di decessi evitati", e' possibile che le persone anziane abbiano priorita' – dato per assunto che siano in grado di produrre una

risposta anticorpale adeguata al vaccino usato. .Ma se la preoccupazione principale e' quella di minimizzare la perdita di anni-di-vita, allora potrebbe essere meglio usare i vaccini a disposizione per adulti giovani e di media eta' (Simonsen 2004)'.

Il governo australiano ha ammesso che, nel caso di una pandemia, la sua scorta di antivirali sara' limitata e riservata per individui in una lista di razioni confidenziale (Lokuge 2006). Chi sono gli individui in questa lista? Medici, pompieri, agenti di polizia – o politici e altri VIP?

Esperti nel campo suggeriscono che uno schema per determinare gruppi di priorita' debba essere sviluppato prima dell'inizo di una pandemia, che tale schema venga approvato in precedenza e che sia abbastanza flessibile da adattarsi ai livelli di disastrosita' che possono verificarsi (Simonsen 2004).

Conclusione

La buona notizia che si trae dalle ricerche epidemiologiche e' che nel passato le pandemie hanno dato segnali di allarme prima di verificarsi (Olson 2005) . Nella primavera del 1918, si verifico' un'ondata pandemica 6 mesi prima della seconda, mortale ondata autunnale.

Il virus dell'influenza asiatica H2N2 fu caratterizzato all'inizio dell'estate, 1957, ma una mortalita' significativa negli Stati Uniti non si verifico' fino ad ottobre – e nel 1968 l'ondata pandemica piu' mortale in Europa ebbe il picco un intero anno dopo la prima apparenza del ceppo pandemico (Simonson 2004).

Gli studi epidemiologici delle pandemie del XX secolo offrono osservazioni che possono rivelarsi utili per prevedere il comportamento della prossima pandemia influenzale (Simonson 2004):

- E' difficile prevedere l'impatto in termini di decessi, ma e' probabile uno spostamento sulle fasce d'eta' piu' giovani e persone di eta' inferiore ai 65 anni saranno nella maggioranza di quei decessi.
- Una pandemia influenzale non e' sempre come una tempesta improvvisa, a cui seguono cieli blu. Al contrario, livelli di mortalita' elevati possono mantenersi per parecchi anni – durante i quali un vaccino effettivo sarebbe di grande necessita'.
- Durante tutte e tre le pandemie influenzali del XX secolo, la maggior parte di decessi associati alla pandemia si verificarono in un periodo da 6 mesi ad un anno dopo la prima apparenza del ceppo pandemico, il che suggerisce che una sorveglianza intensa e tempestiva della mortalita' specifica per una certa eta' correlata a nuovi virus influenzali potrebbe fornire tempo sufficente per la produzione e la distribuzione di vaccini e farmaci antivirali che possono prevenire molto, se non la maggior parte, dell'impatto di mortalita'.

La prossima pandemia arrivera', ma non sappiamo quando. Non sappiamo che severita' avra'. Sara' lieve come le due pandemie del 1968 e del 1957, quando il nuovo ceppo pandemico risulto' dal riassortimento di ceppi pre-esistenti umani e aviari? O sara' catastrofica come la pandemia del 1918?

Solo il futuro ce lo rivelera'. Bisogna che ci trovi prepaarti!

Golden Links

Influenza. Special Issue of the Journal of Emerging Infectious Diseases, 2006. http://www.cdc.gov/ncidod/EID/index.htm

Pandemic Influenza: Confronting a Re-emergent Threat. Special Issue of the Journal of Infectious Diseases, 1997.
http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/contents/v176nS1.html

Interviews

Interview with Dr. Jeffrey Taubenberger. Spanish and avian flu pandemics. Nature Podcast, 6 October 2006 – http://www.nature.com/nature/podcast/v437/n7060/nature-2005-10-06.mp3

Interview with Dr. Frederick Hayden on antiviral resistance in influenza viruses. 23 February 2006 – http://content.nejm.org/cgi/content/full/354/8/785/DC1

Interview with Dr. Anne Moscona on the clinical implications of oseltamivir resistance. 22 December 2005 – http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2633/DC1

Interview with Dr. Michael Osterholm on preparing for an influenza pandemic. 5 May 2005 – http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/18/1839/DC1

References

1. Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, et al. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. Virology 2006; 344: 480-91. Epub 2005 Sep 27. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16194557
2. Aoki FY, Macleod MD, Paggiaro P, et al. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 123-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12493796 – Full text at http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/full/51/1/123
3. Apisarnthanarak A, Kitphati R, Thongphubeth K, et al. Atypical avian influenza (H5N1). Emerg Infect Dis 2004; 10: 1321-4. http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no7/04-0415.htm
4. Balicer RD, Huerta M, Davidovitch N, Grotto I. Cost-benefit of stockpiling drugs for influenza pandemic. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1280-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16102319 – Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no08/04-1156.htm
5. Barry JM. 1918 revisited: lessons and suggestions for further inquiry. In: Board on Global Health. The Threat of Pandemic Influenza: Are We Ready? The National Academies Press 2004. Available from http://darwin.nap.edu/books/0309095042/html/58.html
6. Basler CF, Reid AH, Dybing JK, et al. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 2746-51. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11226311 – Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/98/5/2746
7. Behrens G, Stoll M. Pathogenesis and Immunology. In: Influenza Report. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Flying Publisher, Wuppertal, 2006. – Full text at http://www.influenzareport.com/ir/pathogen.htm
8. Bright RA, Medina MJ, Xu X, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. Lancet 2005; 366: 1175-81. Epub 2005 Sep 22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16198766

9. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. JAMA 2006; 295: 891-4. Epub 2006 Feb 2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16456087

10. Butler D. Thai dogs carry bird-flu virus, but will they spread it? Nature 2006; 439: 773. http://amedeo.com/lit.php?id=16482119

11. Butler D. Wartime tactic doubles power of scarce bird-flu drug. Nature 2005; 438: 6. http://amedeo.com/lit.php?id=16267514

12. Buxton Bridges C, Katz JM, Seto WH, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. J Infect Dis 2000; 181: 344-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10608786 – Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v181n1/990819/990819.html

13. CDC 1997. Isolation of Avian Influenza A(H5N1) Viruses from Humans – Hong Kong, May-December 1997. MMWR 1997; 46: 1204-7. Full text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00050459.htm

14. CDC 1998. Update: Isolation of Avian Influenza A(H5N1) Viruses from Humans – Hong Kong, 1997-1998. MMWR 1998; 46: 1245-47. Full text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00050775.htm

15. CDC 2005. Centers for Disease Control. Prevention and Control of Influenza Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2005; 54 (RR08): 1-40. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5408a1.htm

16. CDC 2006. High levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents--United States, 2005-06 influenza season. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006; 55: 44-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16424859 – Full text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5502a7.htm

17. CDC 2006b. Influenza vaccination of health-care personnel: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) and the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2006; 55: 1-16. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16498385 – Full text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5502a1.htm

18. CDC 2006c. Increased antiviral medication sales before the 2005-06 influenza season--New York City. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006; 55: 277-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16543882 – Full text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5510a3.htm

19. Chan PK. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. Clin Infect Dis 2002; 34: Suppl 2: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11938498 – Full text at http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v34nS2/010992/010992.html

20. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? Lancet 2002; 360: 1831-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12480361

21. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. Emerg Infect Dis 2005; 11: 201-9. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol11no02/04-1061.htm

22. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet 1998; 351: 472-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482438 – http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673697112120/fulltext

23. de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, et al. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. N Engl J Med 2005; 352: 686-91. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15716562 – Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/7/686

24. de Jong MD, Tran TT, Truong HK, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. N Engl J Med 2005b; 353: 2667-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16371632 – Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2667

25. Demicheli V, Jefferson T, Rivetti D, Deeks J. Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. Vaccine 2000; 18: 957-1030. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10590322

26. Diggory P, Fernandez C, Humphrey A, Jones V, Murphy M. Comparison of elderly people´s technique in using two dry powder inhalers to deliver zanamivir: randomised controlled trial. BMJ 2001; 322: 577-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11238150 – Full text at http://bmj.bmjjournals.com/cgi/content/full/322/7286/577

27. Dowdle WR. Influenza A virus recycling revisited. Bull World Health Organ 1999; 77: 820-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10593030 – Full text at http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1999/Vol77-No10/bulletin_1999_77(10)_820-828.pdf

28. Dowdle WR. Influenza Pandemic Periodicity, Virus Recycling, and the Art of Risk Assessment. Emerg Infect Dis; 12: 34-9. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol12no01/05-1013.htm

29. Dowdle WR. Pandemic influenza: confronting a re-emergent threat. The 1976 experience. J Infect Dis 1997; 176: Suppl 1: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9240699

30. Du Ry van Beest Holle M, Meijer A, Koopmans M, de Jager C. Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. Euro Surveill 2005; 10. Full text at http://www.eurosurveillance.org/em/v10n12/1012-222.asp

31. Fedson DS. Preparing for pandemic vaccination: an international policy agenda for vaccine development. J Public Health Policy 2005; 26: 4-29. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15906873

32. Ferguson NM, Cummings DA, Cauchemez S, et al. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. Nature 2005; 437: 209-14. Epub 2005 Aug 3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16079797

33. Fiers W, De Filette M, Birkett A, Neirynck S, Min Jou W. A "universal" human influenza A vaccine. Virus Res 2004; 103: 173-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15163506

34. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005; 79: 2814-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15709000 – Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/79/5/2814?view=long&pmid=15709000

35. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 1356-61. http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/5/1356

36. Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. Virology 2006; 344: 432-8. Epub 2005 Oct 13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16226289

37. Gao W, Soloff AC, Lu X, et al. Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. J Virol 2006; 80: 1959-64. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16439551

38. Garner JS, and the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. Part II. Recommendations for isolation precautions in hospitals. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Am J Infect Control 1996; 24: 32-52. Full text at at http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation_ptII.html

39. Gaydos JC, Top FH, Hodder RA, Russell PK. Swine Influenza A Outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. Emerg Infect Dis 2006; 12: 9-14. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-0965.htm

40. Gilbert M. Free-grazing Ducks and Highly Pathogenic Avian Influenza, Thailand. Emerg Infect Dis 2006; 12: 227-34. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16494747 – Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no02/05-0640.htm

41. Goto H, Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 10224-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9707628 – Full text http://www.pnas.org/cgi/content/full/95/17/10224

42. Goto H, Wells K, Takada A, Kawaoka Y. Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus. J Virol 2001; 75: 9297-301. Abstract:

http://amedeo.com/lit.php?id=11533192 – Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/19/9297?pmid=11533192

43. Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, et al. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. J Virol 2005; 79: 2191-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15681421 – Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/79/4/2191

44. Gürtler L. Virology of Human Influenza. In: Influenza Report. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Flying Publisher, Wuppertal, 2006. – Full text at http://www.influenzareport.com/ir/virol.htm

45. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. Science 2001; 293: 1840-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11546875 – Full text at http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/293/5536/1840

46. Hayden F, Klimov A, Tashiro M, et al. Neuraminidase inhibitor susceptibility network position statement: antiviral resistance in influenza A/H5N1 viruses. Antivir Ther 2005; 10: 873-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16430192

47. Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, et al. Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. N Engl J Med 1999; 341: 1336-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10536125 – Full text http://content.nejm.org/cgi/content/full/341/18/1336

48. Hayden FG, Belshe R, Villanueva C, et al. Management of influenza in households: a prospective, randomized comparison of oseltamivir treatment with or without postexposure prophylaxis. J Infect Dis 2004; 189: 440-9. Epub 2004 Jan 26. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14745701 – Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v189n3/31422/31422.html

49. Hayden FG, Gubareva LV, Monto AS, et al. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. Zanamivir Family Study Group. N Engl J Med 2000; 343: 1282-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11058672 – Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/343/18/1282

50. Hayden FG, Osterhaus AD, Treanor JJ, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenzavirus infections. GG167 Influenza Study Group. N Engl J Med 1997; 337: 874-80. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9302301 – Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/337/13/874

51. Hayden FG. Antiviral Resistance in Influenza Viruses — Implications for Management and Pandemic Response. N Engl J Med 2006; Volume 354:785-8. Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/354/8/785

52. Hedrick JA, Barzilai A, Behre U, et al. Zanamivir for treatment of symptomatic influenza A and B infection in children five to twelve years of age: a randomized controlled trial. Pediatr Infect Dis J 2000; 19: 410-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10819336

53. Herlocher ML, Truscon R, Elias S, et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. J Infect Dis 2004; 190: 1627-30. Epub 2004 Sep 28. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15478068 – Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/abstract/45/4/1216

54. Hien TT, Liem NT, Dung NT, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N Engl J Med 2004; 350: 1179-88. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14985470 – Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/350/12/1179

55. Hoelscher MA, Garg S, Bangari DS, et al. Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. Lancet 2006; 367: 475-81. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16473124

56. Hoffmann C, Kamps BS. Clinical presentation. In: Influenza Report. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Flying Publisher, Wuppertal, 2006a. – Full text at http://www.influenzareport.com/ir/cp.htm

57. Hoffmann C, Kamps BS. Treatment and Prophylaxis. In: Influenza Report. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Flying Publisher, Wuppertal, 2006b. – Full text at http://www.influenzareport.com/ir/tr.htm

58. Hoffmann C, Rockstroh J, Kamps BS. HIV Medicine 2005. Flying Publisher, Wuppertal, 2005. – Full text at http://www.HIVMedicine.com

59. Holmes EC, Ghedin E, Miller N, et al. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. PLoS Biol 2005; 3: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16026181 – Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16026181

60. Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, et al. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 10682-7. Epub 2005 Jul 19. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16030144

61. Jefferson T, Rivetti D, Rivetti A, Rudin M, Di Pietrantonj C, Demicheli V. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines in elderly people: a systematic review. Lancet 2005; 366: 1165-74. Epub 2005 Sep 22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16198765

62. Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. Bull Hist Med 2002; 76: 105-15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11875246

63. Kaiser L, Wat C, Mills T, Mahoney P, Ward P, Hayden F. Impact of oseltamivir treatment on influenza-related lower respiratory tract complications and hospitalizations. Arch Intern Med 2003; 163: 1667-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12885681 – Full text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/abstract/163/14/1667

64. Katz JM, Lim W, Bridges CB, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. J Infect Dis 1999; 180: 1763-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10558929 – Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v180n6/990415/990415.html

65. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. J Virol 1989; 63: 4603-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2795713 – Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=2795713

66. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg Infect Dis 2004; 10: 2189-91. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15663858 – Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no12/04-0759.htm

67. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. Emerg Infect Dis 2006; 12: 9-14. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1254.htm

68. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet 2004; 364: 759-65. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15337401

69. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet 2004; 363: 587-93. Full text at http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS014067360415589X/fulltext

70. Korsman S. Vaccines. In: Influenza Report 2006. Flying Publisher, Wuppertal, 2006 – Available from http://www.influenzareport.com/ir/vaccines.htm

71. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, et al. Avian H5N1 influenza in cats. Science 2004; 306: 241. Epub 2004 Sep 2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15345779

72. Lazzari S, Stohr K. Avian influenza and influenza pandemics. Bull World Health Organ 2004; 82: 242. http://amedeo.com/lit.php?id=15259251 – Full text at http://www.who.int/entity/bulletin/volumes/82/4/242.pdf

73. Le QM, Kiso M, Someya K, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. Nature 2005; 437: 1108. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16228009

74. Lee VJ. Economics of neuraminidase inhibitor stockpiling for pandemic influenza, singapore. Emerg Infect Dis 2006; 12: 95-102. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16494724 – Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-0556.htm

75. Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature 2004; 430: 209-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15241415

76. Li S, Schulman J, Itamura S, Palese P. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. J Virol 1993; 67: 6667-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8411368 – Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=8411368

77. Lokuge B, Drahos P, Neville W. Pandemics, antiviral stockpiles and biosecurity in Australia: what about the generic option? Med J Aust 2006; 184: 16-20. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16398625 – Full text at http://www.mja.com.au/public/issues/184_01_020106/lok10852_fm.html

78. Longini IM Jr, Nizam A, Xu S, et al. Containing pandemic influenza at the source. Science 2005; 309: 1083-7. Epub 2005 Aug 3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16079251

79. Louria DB, Blumenfeld HL, Ellis JT, Kilbourne ED, Rogers DE. Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. J Clin Invest 1959; 38: 213-65. Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=13620784

80. Ma KK, Schaffner W, Colmenares C, Howser J, Jones J, Poehling KA. Influenza vaccinations of young children increased with media coverage in 2003. Pediatrics 2006; 117: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16452325

81. Maines TR, Lu XH, Erb SM, et al. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. J Virol 2005; 79: 11788-800. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16140756

82. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. J Virol 2000; 74: 8502-12. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10954551 – Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/18/8502

83. Monto AS, Fleming DM, Henry D, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B virus infections. J Infect Dis 1999; 180: 254-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10395837 – Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v180n2/990003/990003.html

84. Monto AS, Robinson DP, Herlocher ML, Hinson JM Jr, Elliott MJ, Crisp A. Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. JAMA 1999; 282: 31-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10404908 – Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/282/1/31

85. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. N Engl J Med 2005; 353: 1363-73. http://amedeo.com/lit.php?id=16192481 – Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/13/1363

86. Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. Nat Med 1999; 5: 1157-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10502819

87. Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. Lancet 2000; 355: 1845-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10866439

88. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. Lancet 2003; 362: 1733-45. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14643124

89. Noah DL, Krug RM. Influenza virus virulence and its molecular determinants. Adv Virus Res 2005; 65: 121-45. http://amedeo.com/lit.php?id=16387195

90. Noda T, Sagara H, Yen A, et al. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. Nature 2006; 439: 490-492. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16437116

91. Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. Science 2006; 311: 1576-80. Epub 2006 Jan 26. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16439620

92. Olson DR, Simonsen L, Edelson PJ, Morse SS. Epidemiological evidence of an early wave of the 1918 influenza pandemic in New York City. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:

11059-63. Epub 2005 Jul 26. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16046546 – Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/102/31/11059

93. Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. N Engl J Med 2005; 352: 1839-42. Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/18/1839

94. Palese P. Making better influenza virus vaccines? Emerg Infect Dis 2006. Available from http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1043.htm

95. Peiris JS, Yu WC, Leung CW, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. Lancet 2004; 363: 617-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14987888

96. Perkins LE, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. Avian Dis 2002; 46: 53-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11924603

97. Peters PH Jr, Gravenstein S, Norwood P, et al. Long-term use of oseltamivir for the prophylaxis of influenza in a vaccinated frail older population. J Am Geriatr Soc 2001; 49: 1025-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11555062

98. Poole P, Chacko E, Wood-Baker R, Cates C. Influenza vaccine for patients with chronic obstructive pulmonary disease. Cochrane Database Syst Rev 2006. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16437444

99. ProMED 20060211.0463. Avian influenza, human˜ Worldwide (02); Demographics of human avian influenza. Archive number 20060211.0463. Available at http://www.promedmail.org/

100. ProMED 20060216.0512. Avian Influenza, human: Genetic risk? Promed number 20060216.0512. Accessed on 17 February 2006 – Available at http://www.promedmail.org/

101. ProMED 20060224.0603. South Korea - asymptomatic human infection. Promed number 20060224.0603. Accessed on 25 February 2006 – Available at http://www.promedmail.org/

102. ProMED 20060322.0893. Avian Influenza's Human-attack Pathway Revealed. Promed number 20060322.0893. Accessed on 23 March 2006 – Available at http://www.promedmail.org/

103. Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 1651-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9990079 – Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/96/4/1651

104. Reyes-Terán. Pandemic Preparedness. In: Influenza Report. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Flying Publisher, Wuppertal, 2006a. – Full text at http://www.influenzareport.com/ir/pp.htm

105. Rimmelzwaan GF, van Riel D, Baars M, et al. Influenza A Virus (H5N1) Infection in Cats Causes Systemic Disease with Potential Novel Routes of Virus Spread within and between Hosts. Am J Pathol 2006; 168: 176-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16400021

106. Salomon R, Franks J, Govorkova EA, et al. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. J Exp Med 2006; Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16533883

107. Schonberger LB, Bregman DJ, Sullivan-Bolyai JZ, et al. Guillain-Barre syndrome following vaccination in the National Influenza Immunization Program, United States, 1976--1977. Am J Epidemiol 1979; 110: 105-23. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=463869

108. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. Nat Med 2002; 8: 950-4. Epub 2002 Aug 26. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12195436

109. Shortridge KF. Pandemic influenza: a zoonosis? Semin Respir Infect 1992; 7: 11-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1609163

110. Shortridge KF. Pandemic influenza: a zoonosis? Semin Respir Infect 1992; 7: 11-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1609163

111. Simonsen L, Clarke MJ, Schonberger LB, Arden NH, Cox NJ, Fukuda K. Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. J Infect Dis 1998; 178: 53-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9652423 – Full text at http://www.journals.uchicago.edu/cgi-bin/resolve?JIDv178p53PDF

112. Simonson L. Pandemic influenza and mortality: past evidence and projections for the future. In: Board on Global Health. The Threat of Pandemic Influenza: Are We Ready? The National Academies Press 2004. Available from http://darwin.nap.edu/books/0309095042/html/89.html

113. Smith S, Demicheli V, Di Pietrantonj C, et al. Vaccines for preventing influenza in healthy children. Cochrane Database Syst Rev 2006. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16437500

114. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. Science 2006; Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16543414

115. Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science 1998; 279: 393-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9430591 – Full text at http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/279/5349/393

116. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 influenza: the mother of all pandemics. Emerg Infect Dis 2006; 12: 15-22. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-0979.htm

117. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. Science 1997; 275: 1793-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9065404 – Full text at http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/275/5307/1793

118. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature 2005; 437: 889-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16208372

119. Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. Emerg Infect Dis 2005; 11: 699-701. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15890122 – Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no05/05-0007.htm

120. Thorson A, Petzold M, Chuc NTK, Ekdahl K. Is Exposure to Sick or Dead Poultry Associated With Flulike Illness? Arch Intern Med 2006; 166: 119-123. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16401820

121. Tiensin T, Chaitaweesub P, Songserm T, Chaisingh A, Hoonsuwan W, Buranathai C, et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. 2005 Oct 19. Available from http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no11/05-0608.htm

122. Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US Oral Neuraminidase Study Group. JAMA 2000; 283: 1016-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10697061 – Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/full/283/8/1016

123. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science 2005; 310: 77-80. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16210530

124. Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Mikulasova A, et al. Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 13849-54. Epub 2002 Oct 4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12368467 – Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/99/21/13849

125. Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Mikulasova A, et al. Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 13849-54. Epub 2002 Oct 4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12368467 – Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/99/21/13849

126. Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, et al. Influenza A H5N1 replication sites in humans. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1036-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16022777

127. Welliver R, Monto AS, Carewicz O, et al. Effectiveness of oseltamivir in preventing influenza in household contacts: a randomized controlled trial. JAMA 2001; 285: 748-54. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11176912 – Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/285/6/748

128. WHO 20000824. Donation of three million treatments of oseltamivir to WHO will help early response to an emerging influenza pandemic.
http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr36/en/index.html – Access 14 January 2006.

129. WHO 2004. WHO interim guidelines on clinical management of humans infected by influenza A(H5N1). Available from
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/clinicalmanage/en/index.html – accessed on 14 January 2006.

130. WHO 20041029. Laboratory study of H5N1 viruses in domestic ducks: main findings. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/labstudy_2004_10_29/en. Accessed 30 October 2005.

131. WHO 2005. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO). Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. – Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/extract/353/13/1374

132. WHO 20050818. Geographical spread of H5N1 avian influenza in birds. Available from http://www.who.int/csr/don/2005_08_18/en – Accessed on 26 January 2006.

133. WHO 20051223. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. 23 December 2005. Accessed at
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2005_12_23/en/index.htm l

134. WHO 2005b. Avian influenza: assessing the pandemic threat. Available from http://www.who.int/csr/disease/influenza/WHO_CDS_2005_29/en – Accessed on 16 January 2006

135. WHO 200601. Avian influenza (" bird flu") – Fact sheet. January 2006. Available from http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avianinfluenza_factsheetJan2006/en/index.html – Accessed on 26 January 2006.

136. WHO 20060114. Cumulative number of confirmed human cases of avian Influenza A /(H5N1) reported to WHO. Available from http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en – Accessed on 17 January 2006.

137. WHO 20060220. Avian influenza: significance of mutations in the H5N1 virus. Available from http://www.who.int/csr/2006_02_20/en/index.html – Accessed on 25 February 2006.

138. WHO 20060228. H5N1 avian influenza in domestic cats. Available from http://www.who.int/csr/don/2006_02_28a/en/index.html – Accessed on 28 February 2006.

139. WHO 20060309. Avian influenza – H5N1 infection found in a stone marten in Germany. Available from http://www.who.int/csr/don/2006_03_09a/en/index.html – Accessed on 15 March 2006.

140. WHO 20060321. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. Accessed on 23 February 2006 from
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_03_21/en/index.htm l

141. WHO 2006a. World Health Organization Writing Group. Nonpharmaceutical interventions for pandemic influenza, national and community measures. Emerg Infect Dis. 2006 Jan. Available from http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1371.htm

142. WHO 2006b. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2006-2007 northern hemisphere influenza season. Available at
http://www.who.int/csr/disease/influenza/recommendations2007north/en/index.html – Accessed on 14 March 2006.

143. WHO 2006c. WHO pandemic influenza draft protocol for rapid response and containment. Available at http://InfluenzaReport.com/link.php?id=18 – Accessed 17 March 2006.

144. WHO 2006d. Advice on use of oseltamivir. Available from http://InfluenzaReport.com/link.php?id=17; accessed 17 March 2006.

145. WHO Checklist 2005. WHO checklist for influenza pandemic preparedness planning. Available from
http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_4/en/inde x.html – Accessed on 16 January 2006.

146. WHO Situation Updates. Available from http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/updates/en/index.html – Accessed on 26 January 2006.

147. Winkle S. Kulturgeschichte der Seuchen. Komet; Frechen 1997.

148. Wong SS, Yuen KY. Influenza vaccination: options and issues. Hong Kong Med J 2005; 11: 381-90. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16219958 – Full text at http://www.hkmj.org.hk/hkmj/abstracts/v11n5/381.htm

149. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482437 – Full text at http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673698011829/fulltext

150. Yuen KY, Wong SS. Human infection by avian influenza A H5N1. Hong Kong Med J 2005; 11: 189-99. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15951584 – Full text at http://www.hkmj.org.hk/hkmj/abstracts/v11n3/189.htm

151. Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza. J Antimicrob Chemother 1999; 44: Suppl : 3-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10877456 – Full text at http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/44/suppl_2/3

152. Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. J Virol 2002; 76: 4420-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11932409 – Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/76/9/4420

Chapter 2: Influenza Aviaria

Timm C. Harder and Ortrud Werner

Introduzione

(Green links: Free full-text articles)

L'influenza aviaria altamente patogenica, o, come fu definita in origine, "peste degli uccelli acquatici", venne inizialmente riconosciuta come una malattia infettiva del pollame in Italia nel 1878 (Perroncito 1878). A causa di un focolaio iniziale nella vallata superiore del Po venne anche definita come "malattia Lombarda" . Sebbene Centanni e Savonuzzi, nel 1901, identificarono un agente filtrabile responsabile per la malattia, bisogno' aspettare fino al 1955 perche' Schafer caratterizzasse questo agente come il virus A dell'influenza (Schafer 1955). Nella popolazione naturale di ospiti del virus che ha le funzioni di bacino di riserva, gli uccelli acquatici selvatici, l'infezione si sviluppa in maniera interamente asintomatica dal momento che che biotipi di virus A dell'influenza di bassa patogenicita' coesistono in equilibrio quasi perfetto con questi ospiti (Webster 1992, Alexander 2000).

Quando ceppi di virus aviario dell'influenza a bassa patogenicita' (low pathogenic avian influenza virus LPAIV) vengono trasmessi da ospiti aviari naturali a specie di pollame altamente suscettibili come polli e tacchini (cioe' una trasmissione transspecie!), generalmente ci si trova davanti a sintomi lievi. Tuttavia, nei casi in cui le specie di pollame sono in grado di mantenere parecchi cicli di infezione, questi ceppi possono subire una serie di mutazioni che risultano in un adattamento al nuovo ospite. I virus A dell'influenza sottotipo H5 e H7 non solo passano attraverso una fase di adattamento al nuovo ospite, ma e' possibile che abbiano saltuariamente la capacita' di cambiare, con mutazioni di tipo inserzionale, in una forma altamente patogenica (higly pathogenic avian influenza viruses HPAIV) che e' in grado di indurre una malattia che interessa tutti i sistemi dell'ospite e che si rivela rapidamente mortale. Questi tipi di virus HPAIV possono sorgere imprevidibilmente *de novo* in pollame infetto con LPAI progenitori di sottotipio H5 e H7.

Nel pollame, HPAI si sviluppa tipicamente con un attacco improvviso, malattia severa di breve durata e mortalita' che raggiunge virtualmente il 100% nelle specie suscettibili. A causa delle perdite economiche eccessive per l'industria del pollame, l'HPAI riceve attenzione immensa nel mondo della veterinaria ed e' immediatamente trattata a livello mondiale come una malattia da notificare alle autorita' quando sospettata. A causa della possibilita' che dia luogo a HPAIV, anche LPAI causata da sottotipi H5 e H7 e' considerata notificabile (OIE 2005). Prima del 1997, HPAI era una malattia fortunatamente rara, con solamente 24 casi di epidemia registrati a livello mondiale a partire dal 1950 (Tavola 1).

Recentemente, tuttavia, l'influenza aviaria ha acquisito attenzione in tutto il mondo a causa di un ceppo del sottotipo H5N1 altamente patogenico che si sviluppo' probabilmente prima del 1997 nel sud della Cina, divento' enzootico nel pollame nel Sud Est Asiatico e inaspettatamente "attraverso' le barriere di classe" (Perkins and Swayne 2003) quando venne trasmesso da uccelli a mammiferi (gatti, suini, esseri umani). Sebbene questo non sia un evento completamente senza precedenti

(Koopmans 2004, Hayden and Croisier 2005), il numero sostanziale di casi documentati negli esseri umani, associati con malattia severa e parecchie fatalita' sollevarono parecchie preoccupazioni sulla possibilita' che il ceppo H5N1 avesse potenziale pandemico (Klempner and Shapiro 2004; Webster 2006). Ci sono parecchie ulteriori linee di evidenza – discusse in seguito – che suggeriscono che il virus H5N1 ha acquisito una aumentata potenzialita' patogenica per numerose specie di mammiferi. E' giustificabile che questo abbia causato preoccupazione nel pubblico di tutto il mondo (Kaye and Pringle 2005).

Tavola 1: Epidemie mondiali di influenza aviaria altamente patogenica accadute in precedenza1

Anno	Paese/area	Uccelli domestici affetti	Ceppo
1959	Scozia	2 stormi di uccelli (riportati)	A/chicken/Scotland/59 (H5N1)
1963	Inghilterra	29,000 allevatori di tacchini	A/turkey/England/63 (H7N3)
1966	Ontario (Canada)	8,100 allevatori di tacchini	A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9)
1976	Vittoria (Australia)	25,000 galline da uova, 17,000 pollastri, 16,000 anatre	A/chicken/Victoria/76 (H7N7)
1979	Germania	1 stormo di 600,000 polli, 80oche	A/chicken/Germany/79 (H7N7
1979	Inghilterra	3 allevamenti commerciali di tacchini (numero di uccelli totale non riportato)	A/turkey/England/199/79 (H7N7)
1983-1985	Pensilvania (USA)*	17 milioni di uccelli in 452 stormi; la maggior parte polli o tacchini, qualche pernice e gallina faraona	A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2)
1983	Irlanda	800 tacchini da macello morti; 8,640 tacchini, 28,020 polli, 270,000 anatre vennero eliminati	A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8)
1985	Vittoria (Australia)	24,000 allevatori di pollastri, 27,000 galline da uova, 69,000 pollastri, 118,418 polli di tipo non specificato	A/chicken/Victoria/85 (H7N7)
1991	Inghilterra	8,000 tacchini	A/turkey/England/50-92/91 (H5N1)
1992	Vittoria (Australia)	12,700 allevatori di pollastri, 5,700 anatre	A/chicken/Victoria/1/92 (H7N3)
1994	Queensland (Australia)	22,000 galline da uova	A/chicken/Queensland/667-6/94 (H7N3)
1994-1995	Messico*	Numero totale di uccelli non disponibile, 360 stormi di polli da commercio vennero eliminati	A/chicken/Puebla/8623-607/94 (H5N2)
1994	Pakistan*	3.2 milioni di pollastri e pollastri da riproduzione	A/chicken/Pakistan/447/95 (H7N3)
1997	Hong Kong (Cina)	1.4 milioni di polli e vari numeri inferiori di altri uccelli domestici	A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1)

Anno	Paese/area	Uccelli domestici affetti	Ceppo
1997	New South Wales (Australia)	128,000 pollastri da riporduzione, 33,000 pollastri, 261 emu	A/chicken/New South Wales/1651/97 (H7N4)
1997	Italia	Approx. 6,000 polli, tacchini, galline faraone, anatre, quaglie, piccioni, oche, fagiani	A/chicken/Italy/330/97 (H5N2)
1999-2000	Italia*	413 allevamenti, approx. 14 milioni di uccelli	A/turkey/Italy/99 (H7N1)
2002-2005	SE Asia*	Cina, Hong Kong, Indonesia, Giappone, Cambogia, Laos, Malesia, Corea, Tailandia, Vietnam, approx. 150 milioni di uccelli	A/chicken/East Asia/2003-2005 (H5N1)
2002	Cile		A/chicken/Chile/2002 (H7N3)
2003	Paesi Bassi*	Olanda: 255 allevamenti, 30 milioni di uccelli; Belgio: 8 fattorie, 3 milioni di uccelli; Germania: 1 allevamento, 80,000 pollastri	A/chicken/Netherlands/2003 (H7N7)
2004	Canada (B.C.)*	53 stormi, 17 milioni di polli	A/chicken/Canada-BC/ 2004 (H7N3)
2004	Stati Uniti (TX)	6,600 pollastri	A/chicken/USA-TX/2004 (H5N2)
2004	Sud Africa	23,700 griselle, 5,000 polli	A/ostrich/S.Africa/2004 (H5N2)

1 Modificato da Capua e Mutinelli, 2001

* Epidemie con propagazione significativa a numerosi allevamenti, che sono risultate in maggiori perdite economiche. La maggior parte delle altre epidemie furono associate con una ristretta o con nessuna propagazione dalle fattorie all'indice.

I virus

I virus dell'influenza o hanno forma sferica o sono particelle di forma longitudinale coperte da membrana con un genoma a polarita' negativa segmentato fino ad otto volte. I virus dell'influenza sono generalmente collocati nella famiglia Orthomyxoviridae e sono classificati come virus A, B o C sulla base di differenze antigeniche delle proteine nucleari o della matrice. I virus dell'influenza aviaria (AIV) appartengono al tipo A. Reviews di eccellente valore sulla struttura e la strategia per la replicazione dei virus dell'influenza sono state pubblicate di recente (e.g. Sidoronko and Reichl 2005).

I determinanti antigenici principali per i virus A e B dell'influenza sono le glicoproteine transmembrana emagglutinina (H o HA) e neuraminidasi (N o NA), che sono in grado di stimolare risposte immunitarie specifice per i diversi sottotipi che sono protettive all'interno, ma solamente parzialmente protettive tra, sottotipi differenti. Sulla base della antigenicita' di queste glicoproteine, i virus A dell'influenza sono al momento raggruppati i sedici sottotipi H (H1 – H16) e nove sottotipi N (N1 – N9). Questi gruppi dimostrano consistenza se si analizzano filogeneticamente le sequenze nucleotidiche e le sequenze dedotte degli aminoacidi dei geni HA e NA rispettivamente (Fouchier 2005).

La nomenclatura convenzionale per gli isolati di virus dell'influenza richiede la connotazaione del tipo di virus dell'influenza, le specie ospiti (omesso nel caso di

origine umana), il sito geografico, un numero di serie, e l'anno di isolamento. Per i virus A dell'influenza, i sottotipi di emagglutinina e neuraminidasi vengono aggiunti tra parentesi. Uno dei ceppi aviari progenitore delle epidemie correnti di H5N1 di lineaggio asiatico e' stato isolato da un'oca nella provincia cinese di Guangdong: di conseguenza, e' designato A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) (Xu 1999) mentre l'isolato di lineaggio asiatico derivante dal primo caso documentato di infezione da H5N1 in un essere umano in Hong Kong (Claas 1998) e' designato A/HK/156/97 (H5N1).

L'emagglutinina, una proteina glicosilata e acilata che consiste di 562-566 aminoacidi e' incorporata nell'involucro virale. La testa globulare del suo dominio esterno, distale alla membrana, e simile ad un pomo e' associata con il legame a recettori cellulari composti da oligosaccaridi che contengono derivati dell'acido neuraminico in posizione terminale (Watowich 1994). Il dominio esterno della seconda glicoproteina transmembrana, la neuraminidasi (NA), esercita attivita' enzimatica di tipo sialolitico e libera la progenie virale catturata sulla superficie delle cellule infette durante egressione. Questa funzione previene l'aggregazione virale durante l'egressione, e possibilmente facilita lo scivolamento del virus attraverso gli strati di muco dei tessuti epiteliali bersaglio conducendo ad attaccamento virale (Matrosovich 2004a). Questo rende la neuraminidasi un bersaglio interessante degli agenti antivirali. Azioni mutualmente intonate e coordinate delle glicoproteine antagoniste HA e NA di un ceppo virale sono centrali per un attaccamento effettivo e per il processo di rilascio dei virioni (Wagner 2002).

L'attaccamento dei virioni A dell'influenza avviene tramite la trimerizzazione di glicoproteine virali HA mature. L'attaccamento e' stratificato e dipende dal riconoscimento di specie distinte di acido sialico terminale (N-acetyl- o acido N-glicolylneuraminico), dal tipo di legame glicosidico al penultimo galattosio (α2-3 o α2-6) e dalla composizione di ulteriori frammenti interni di sialyloligosaccaridi presenti sulla superficie cellulare (Herrler 1995, Gambaryan 2005). Una varieta' di sialyloligosaccaridi viene espressa in modo restrittivo in relazione al tessuto e alla specie di origine in vari ospiti dei virus dell'influenza. L'adattamento di entrambe le glicoproteine virali HA e NA al tipo o ai tipi di recettori specifici per una certa specie di ospite e' il prerequisito per una replicazione efficacie (Ito 1999, Banks 2001, Matrosovich 1999+2001, Suzuki 2000, Gambaryan 2004). Questo implica la necessita' di un cambiamento nella forma delle unita' di legame della proteina HA conseguentemente alla trasmissione fra le specie (Gambaryan 2006). Una visione meccanistica dei tipi diversi di ricettori e' data nella figura 1. I virus dell'influenza aviaria generalmente mostrano maggiore affinta' per il legame α2-3 dell'acido sialico visto che questo e' il tipo di recettore dominante in tessuti epiteliali di origine endodermica (tubo digerente, polmoni) negli uccelli attaccati da questo virus (Gambaryan 2005a, Kim 2005). Virus dell'influenza adattati agli esseri umani, al contrario, accedono primariamente a residui legati in posizione 2-6 che prevalgono negli epiteli non ciliati delle vie respiratorie umane. Queste predilezioni recettoriali definiscono parte di una barriera specie specifica che previene una trasmissione senza problemi dei virus aviari ad esseri umani (Suzuki 2000, Suzuki 2005). Ciononostante e' stato dimostrato di recente che esiste una popolazione di cellule ciliate epiteliali nella trachea umana che presenta a basse densita' glicoconiugati simili a quelli aviari (Matrosovitch 2004b), cosi' come cellule dei polli presentano a basse densita' recettori sialici del tipo umano (Kim 2005). Questo potrebbe spiegare

il fatto che gli esseri umani non sono completamente refrattari all'infezione con certi ceppi aviari (Beare and Webster 1991). Nei maiali e nelle quaglie, entrambi i tipi di recettori sono presenti con maggior densita' il che rende queste specie possibili vasi contenitori che consentono il rimescolamento dei ceppi aviari e umani (Kida 1994, Ito 1998, Scholtissek 1998, Peiris 2001, Perez 2003, Wan and Perez 2005).

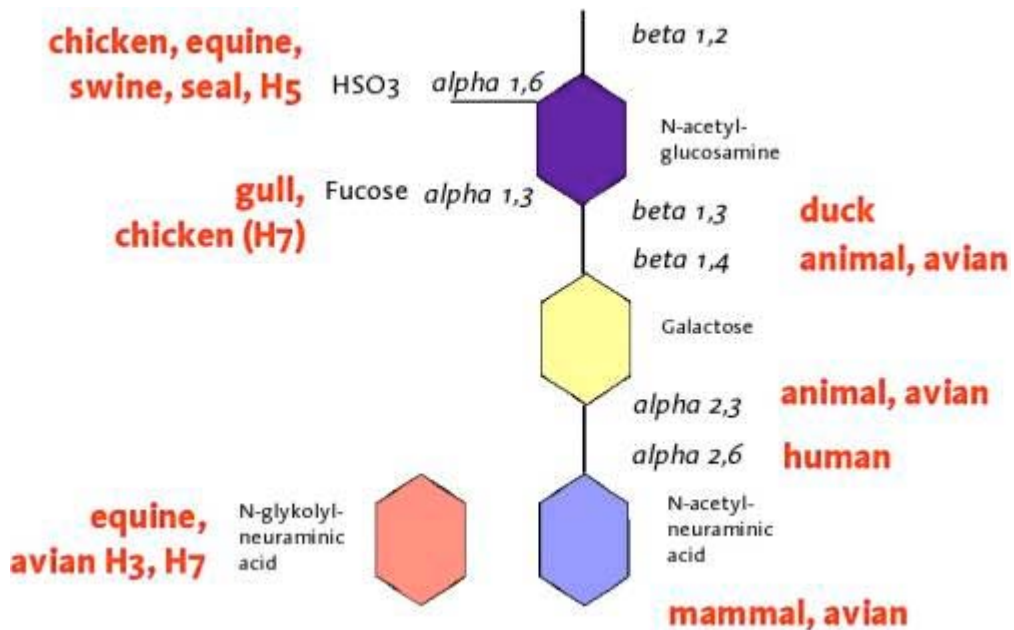



Figura 1. Sommario delle predilizioni dei recettori dei virus A dell'influenza (basata su dati da Gambaryan 2005)

Dopo essersi attaccato con successo ad un recettore adatto, il virione viene internalizzato in un compartimento endosomale usando sia meccanismi clatrina-dipendenti che indipendenti (Rust 2004). Il virus evade la degradazione in questo compartimento tramite la fusione delle membrane virali e endosomali: una cascata di riarrangimenti sterici dellle proteine matrix-1 (M1) e del complesso omotrimerico delle glicoproteine HA incomincia grazie alla mediazione di un trasporto di protoni, che avviene nel'endosoma a pH5, attraverso la proteina tunnel virale matrix-2 (M2). Tutto questo risulta nell'esposizione di un dominio altamente lipofilico e fusogenico in ognuno dei monomeri HA che si inserisce nella membrana endolisosomale, iniziando di conseguenza la fusione delle membrane virali e lisosomali (Haque 2005, Wagner 2005). Successivamente, gli otto segmenti di RNA genomico virale, protetti da uno strato di proteine (N) del nucleocapside (complesso ribonucleoproteico, RNP), vengono rilasciati nel citoplasma. Da qui vengono trasportati al nucleo per la trascrizione di mRNA virali e per la replicazione del genoma virale utilizzando un processo complesso e delicatamente regolato da fattori virali e cellulari (Whittaker 1996). L'RNA polimerasi RNA-

dipendente (RdRp) e' formata da un complesso delle proteine virali PB1, PB2 e PA, e richiede per questo compito RNA encapsidato (RNPs). Successivamente alla traduzione delle proteine virali e all'assemblaggio di nucleocapsidi contenenti l'RNA genomico replicato, la progenie di virioni emerge dalla membrana cellulare nella quale glicoproteine virali sono state precedentemente inserite. La sistemazione delle proteine elicoidali del nucleocapside e dell'involucro virale viene mediata dalla proteina virale matrix-1 (M1) che forma una struttura simile ad un guscio subito sotto all'involucro virale. La riproduzione virale in cellule completamente permissive e' un processo veloce (meno di dieci ore) ed efficiente, sempre che sia presente una costellazione di geni "ottimale" (Rott 1979, Neumann 2004).

A causa della tendenza della RdRp virale a commettere errori e' possibile osservare nei virus dell'influenza un elevato tasso di mutazione $\geq 5 \, x \, 10^{-5}$ cambi di nucleotide per nucleotide e per ciclo di replicazione, che quindi si avvicina quasi ad un cambio di nucleotide per genoma per ciclo di replicazione (Drake 1993). Se pressioni selettive (come anticorpi neutralizzanti, legame sub-ottimale al recettore o antivirali di origine chimica) agiscono durante la replicazione virale a livello di ospite o di popolazione, e' possibile che mutanti con un correspettivo vantaggio selettivo (ad esempio evasione della neutralizzazione, unita' di legame al recettore ristrutturate) siano selezionati e diventino la variante dominante nella quasispecie virale in quell'ospite o in quella popolazione.Se determinanti antigenici delle glicoproteine di membrana HA e NA sono interessati a causa di meccanismi guidati da immunita', tale processo (graduale) viene chiamato *antigenic drift* (deriva antigenica) (Fergusson 2003).

In contrasto, *antigenic shift* (spostamento antigenico) denota un improvviso e profondo cambiamento nei determinanti antigenici, ad esempio uno spostamento di sottotipi H e/o N, all'interno di un singolo ciclo di replicazione. Questo accade in una cellula che e' contmporaneamente infetta da due o piu' virus A dell'influenza di sottotipo differente. Dal momento che la distibuzione dei frammenti virali genomici replicati nella progenie di virioni emergenti e' indipendente dal sottotipo che origina ogni segmento, e' possibile che emerga una progenie competente per la replicazione che porta informazione genetica diversa dai virus progenitori (cosiddetti *riassortiti*) (Webster and Hulse 2004, WHO 2005). Mentre i virus della pandemia influenzale umana del 1957 (H2N2) e del 1968 (H3N2) apparvero chiaramente a causa di riassortimento tra virus umani e aviari, il virus che causo' l'influenza "Spagnola" nel 1918 sembra che sia derivato interamente da una sorgente aviaria (Belshe 2005).

Ospiti naturali

Uccelli acquatici selvatici, in particolare membri dell'ordine *Anseriformes* (anatre e oche) e *Charadriiformes* (gabbiani e uccelli di ripa), sono portatori della intera varieta' dei sottotipi dei virus A dell'influenza, e quindi, molto probabilmente costituiscono la riserva naturale di tutti i virus A dell'influenza (Webster 1992, Fouchier 2003, Krauss 2004, Widjaja 2004). Mentre si pensa che tutte le specie di uccelli sono suscettibili, certe specie di pollame domestico – polli, tacchini, galline faraone, quaglie e fagiani – sono note per essere particolarmente vulnerabili alle sequele di infezioni.

I virus aviari A dell'influenza generalmente non causano malattia nei loro ospiti naturali. Invece, il virus rimane in uno stato di stasi evoluzionaria, come e'

segnalato molecolarmente da tassi di mutazione *N/S* (non-sinonimi contro sinonimi) bassi indicatori di un'evoluzione purificatrice (Gorman 1992, Taubenberger 2005). Virus e ospite sembrano esistere in uno stato di tolleranza mutuale meticolosamente bilanciato, clinicamente dimostrato dall'assenza di malattia e da efficiente replicazione virale. Quantita' consistenti di virus fino a $10^{8.7}$ x 50% della dose uovo-infettiva (EID_{50}) per grammo di feci possono essere escrete (Webster 1978). Quando sono trasmesse a specie di pollame altamente vulnerabile provocano, se provocano sintomi, sintomi generalmente lievi. Virus con questo fenotipo vengono chiamati a bassa patogenicita' (LPAIV) e, in generale, provocano solamente un minimo e transiente declino nella produzione di uova o qualche riduzione nella crescita del peso nel pollame da ingrasso (Capua and Mutinelli 2001). Tuttavia, ceppi dei sottotipi H5 e H7 hanno il potenziale di mutare in una forma altamente patogenica *dopo* la trasmissione e l'adattamento al nuovo ospite di pollame. La nascita di forme altamente patogeniche di H5 o H7 o di altri sottotipi non e' mai stata osservata in uccelli selvatici (Webster 1998). Di conseguenza, si potrebbe guardare alle forme altamente patogeniche come a qualcosa di artificiale, reso possibile solo da interferenza mediata dall'uomo in un sistema naturalmente bilanciato.

Una volta che i fenotipi HPAIV sorgono in pollame domestico, possono essere trasmessi orizzontalmente dal pollame a ritroso nella popolazione di uccelli selvatici. La vulnerabilita' degli uccelli selvatici a malattia indotta da HPAIV sembra avere variazioni grossolane in concordanza con specie, eta' e ceppo virale. Fino all'emergenza della genealogia asiatica H5N1 HPAIV, l'ingresso di HPAIV nella popolazione selvatica di uccelli occorse solo sporadicamente e fu ristretta geograficamente (con la sola eccezione di sterne che morirono come le foglie in Sud Africa nel 1961 [Becker 1966]) tanto che non fu assegnata agli uccelli selvatici una funzione epidemiologica significativa nello spargimento di HPAIV (Swayne and Suarez 2000). E' possibile che tutto questo sia cambiato in modo fondamentale dall'inizio del 2005, quando una grande epidemia di HPAI di genealogia asiatica imparentata a H5N1 venne osservata in migliaia di uccelli acquatici selvatici in una riserva naturale a Lake Quinghai nel nord ovest della Cina (Chen 2005, Liu 2005). E' possibile he questo sia risultato in uno spargimento ulteriore del virus verso l'Europa durante il 2005 (OIE 2005). I dettagli e le conseguenze di questo processo sono descritti di seguito.

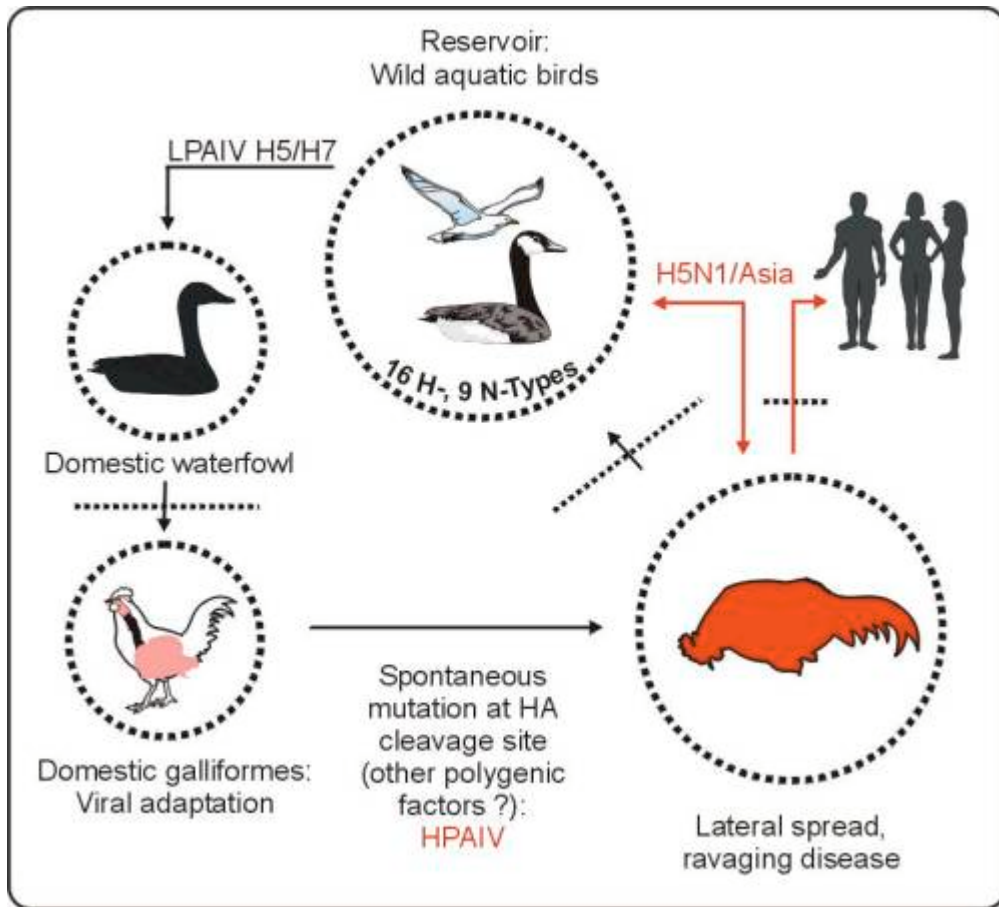



Figura 2. Schema della patogenesi dell'epidemiologia dell'influenza aviaria. LPAIV - low pathogenic avian influenza virus; HPAIV - highly pathogenic avian influenza virus; HA - emagglutinina; linee tratteggiate intersecate da freccie rappresentano barriere fra specie.

HPAI: Patogenesi

La patogenicita' e' una proprieta' dei virus e nei virus A dell'influenza e' un tratto poligenico che dipende in grande misura sulla presenza di una costellazione "ottimale" di geni che hanno effetto, fra le altre cose, sull'ospite e sul tropismo ai tessuti, e sull'efficienza della replicazione e dei meccanismi di evasione immunitaria. In aggiunta, fattori ospite- e specie-specifici contribuiscono allo sviluppo dell'infezione che, in seguito a trasmissione interspecie e' di conseguenza imprevedibile *a priori*. La forma altamente patogenica di influenza aviaria e' stata fin'ora causata da virus A dell'influenza appartenenti esclusivamente ai sottotipi H5 e H7. Tuttavia, solo alcuni rappresentanti dei sottotipi H5 e H7 mostrano di fatto un biotipo altamente patogenico (Swayne and Suarez 2000). Di solito i virus H5 e H7 sono mantenuti stabilmente in una forma a lieve patogenicita' nei loro ospiti

naturali. Da questa riserva, i virus possono essere introdotti, usando percorsi diversi (vedi di seguito), in stormi di pollame. In seguito a un periodo di circolazione variabile e non decisivo (e presumibilmente di adattamento) in popolazioni di pollame suscettibile, questi virus possono saltuariamente mutare nella forma altamente patogenica (Rohm 1995)..

Studi di sequenze nucleotidiche hanno mostrato che la maggior parte dei HPAIV condividono una caratteristica nel gene HA che puo' servire, nel pollame, come marker per la virulenza (Webster 1992, Senne 1996, Perdue 1997, Steinhauer 1999, Perdue and Suarez 2000):

Per essere effettivi, i virioni devono incorporare proteine che sono state processate endoproteiliticamente da un precursore HA_0 a un dimero $HA_{1,2}$ legato da ponte disulfide (Chen 1998). L'N-terminale di nuova creazione della subunita' HA_2 contiene un peptide fusogenico, composto da un dominio altamente lipofilico (Skehel 2001). Questo dominio e' di importanza vitale durante il processo di fusione delle membrane virali e lisosomiali dal momento che inizia il processo di penetrazione dei segmenti genomici nel citoplasma della cellula ospite. Il sito di scissione dei virus HA a bassa patogenicita' e' composto da due aminoacidi basici in posizione -1/-4 (H5) e -1/-3 (H7) (Wood 1993). Questi siti sono accessibili a proteasi tessuto specifiche tipo tripsina che sono espresse di preferenza sulla superificie degli epiteli del tratto gastroenterico e respiratorio. Di conseguenza, si crede che un'efficiente replicazione dei virus LPAI sia confinata nella maggior parte dei casi a questi siti, almeno nei loro ospiti naturali. In contrasto, il sito di scissione nei virus HPAI contiene un eccesso di aminoacidi di tipo basico (arginina e/o lisina) che lo rendono suscettibile al processamento da parte di endoproteasi tipo subtilisina che richiedono specificita' per una sequenza consenso minima -R-X-K/R-R- (Horimoto 1994, Rott 1995). Proteasi di questo tipo (furina, proproteina-convertasi) sono attive in praticamente ogni tessuto. Percio', virus che portano queste mutazioni hanno il vantaggio di potersi replicare senza restrizione e in tutti i sistemi. Questo processo e' stato documentato sul campo in parecchie situazioni. In Italia, per esempio, un virus LPAI H7N1 circolo' per parecchi mesi in popolazioni di tacchini e pollame prima che, nel dicembre 1999, un virus HPAI H7N1, distinguibile dal suo precursore solamente per il suo sito di scissione polibasico, spuntasse all'improvviso causando malattia devastante (Capua 2000).

E' stato ipotetizzato che il gene HA dei sottotipi H5 e H7 contenga specifiche strutture secondarie nell'RNA che favoriscono mutazioni di tipo inserzionale (duplicazione di codoni) causate dal fatto che la polimerasi virale copia piu' volte i tratti di sequenze ricchi in purine che codificano per il sito di scissione endoproteolitico delle proteine HA (Garcia 1996, Perdue 1997). Questo, e probabilmente altri meccanismi, come sostituzione di nucleotidi o ricombinazione intersegmentale (Suarez 2004, Pasick 2005), possono portare all'incorporazione di residui di aminoacidi basici addizionali. Il meccanismo della ricombinazione e' stato provato sperimentalmente grazie alla generazione di HPAIV da precursori LPAIV in seguito a ripetuti passaggi *in vitro* e *in vivo* usando site-directed mutagenesi (Li 1990, Walker and Kawaoka 1993, Horimoto and Kawaoka 1995, Ito 2001). Contratiamente, la rimozione, via reverse genetics, dei siti di scissione polibasici attenua il fenotipo dell' HPAI (Tian 2005).

Ci sono, tuttavia ceppi virali in cui la sequenza nucleotidica che codifica per il sito di scissione HA e il feno/patotipo non corrispondono alle previsioni: un HPAIV

H7N3 cileno che venne alla luce a causa di ricombinaxione intersegmentale mostro' residui aminoacidici basici solo nelle posizioni -1, -4 e -6 (Suarez 2004). Esempi simili esistono per la discendenza H5 (Kawaoka 1984). D'altro canto, un isolato H5N2 del Texas dimostro' la presenza della sequenza consensus per il sito di scissione HPAIV ma venne clinicamente classificato come LPAI (Lee 2005). Questi dati rienfatizzano la natura poligenica ed intricata della patogenicita' del virus dell'influenza.

Fortunatamente, la generazione di fenotipi HPAI nell'ambiente sembra essere un evento raro. Durante gli ultimi 50 anni sono state riportate a livello mondiale solo 24 epidemie primarie di HPAI causate probabilmente da HPAIV nato *de novo* nell'ambiente (Tavola 1)

In aggiunta, e' stato dimostrato che gli HPAIV sono in grado di infettare mammiferi, ed esseri umani in particolare. Questo e' stato osservato specialmente per la discendenza asiatica H5N1 (WHO 2006). La patogenicita' dipendente dall'ospite di HPAIV H5N1 per quanto riguarda i mammiferi e' stata studiata in svariati modelli: topi (Lu 1999, Li 2005a), furetti (Zitzow 2002, Govorkova 2005), scimmie cynomolgous (Rimmelzwaan 2001) e maiali (Choi 2005). Il risultato dell'infezione dipende dal ceppo virale e dalla specie ospite. Sembra che i furetti rispecchino la patogenicita' negli esseri umani meglio dei topi (Maines 2005)..

Un numero di marker genetici che si pensa siano coinvolti con la patogenicita' sono stati localizzati in diversi segmenti del genotipo Z dell' H5N1 (Tavola 2). Tra questi, meccanismi di interferenza tramite il prodotto del gene NS-1 con le prime linee di difesa dell'ospite, come il sistema dell'interferone, hanno ricevuto grande interesse. Sperimentalmente, e'stato dimostrato tramite reverse genetics, che le proteine NS-1 di certi ceppi H5N1 con acido glutammico in posizione 92 sono in grado di evitare gli effetti antivirali di interferone e tumor necrosis factor-alfa, con la conseguenza di una replicazione piu' efficiente nell'ospite e di un processo di eliminazione dall'ospite ridotto (Seo 2002+2004). In aggiunta, il danno mediato dal sistema immunitario che risulta dalla distruzione del network delle citochine causato dalle proteine NS-1 puo' essere in parte responsabile per le lesioni polmonari (Cheung 2002, Lipatov 2005). Tuttavia nessuna delle mutazioni da sola rappresenta un vero prerequisito per la patogenicita' nei mammiferi (Lipatov 2003). Di conseguenza nei mammiferi, gli specifici patotipi sembrano essere guidati, fino ad un certo punto, da costellazioni genetiche ottimali dipendenti dall'ospite (Lipatov 2004).

Tavola 2. Sommario dei loci genomici coinvolti nell'aumentata patogenicita' dei virus di discendenza asiatica H5N1 ad alta patogenicita' nei mammiferi.

Gene, Proteina	Mutazione	Effetti	Referenza
HA	Sito di scissione polibasico endoproteolitico	Vantaggio per la disseminazione sistemica e replicazione (pollame, mammiferi)	varie
NA	Delezione 19-25 aa nella regione del peduncolo	Adattamento alla crescita in polli e tacchini (?)	Matrosovich 1999, Giannecchini 2006
PB2	627K	Aumentata replicazione sistemica in topi	Hatta 2001, Shinya 2004
	701N	Aumentata patogenicita' in topi	Li 2005
PB-1	13P, 678N	Aumentata attivita' della polimerasi; vantaggioso per processi iniziali di adattamento specie-specifici?	Gabriel 2005
NP	319K		
NS-1	92E	Facilitata evasione dale risposte del sistema immunitario, ridotta eliminazione del virus in maiali	Seo 2004

Quadro clinico

Dopo un periodo di incubazione che dura generalmente pochi giorni (ma che puo' durare raramente fino a 21 giorni), a seconda delle caratteristiche dell'isolato, della dose dell'inoculo, della specie, e dell'eta' dell'uccello, il quadro clinico dell'influenza negli uccelli e' variabile e i sintomi sono abbastanza aspecifici (Elbers 2005). Di conseguenza, una diagnosi basata solamente sul quadro clinico e' impossibile.

I sintomi che seguono l'infezione con un AIV a bassa patogenicita' possono essere minimi: penne arruffate, diminuita produzione di uova transitoria o perdita di peso combinata con lieve malattia respiratoria (Capua and Mutinelli 2001). Qualche ceppo LP, come certe discendenze asiatiche H9N2, adattati a replicazione efficiente nel pollame, puo' causare sintomi piu' prominenti e anche mortalita' significativa (Bano 2003, Li 2005).

Nella sua forma altamente patogenica, la malattia in polli e tacchini e' caratterizzata da uno scoppio improviso di sintomi gravi e da una mortalita' che puo' raggiungere il 100% nello spazio di 48 ore (Swayne and Suarez 2000). La diffusione all'interno di uno storno afflitto dall'infezione dipende dal tipo di allevamento: in gruppi di animali che sono allevati in lettiere e in cui il contatto diretto e la mescolanza fra animali e' possibile, la diffusione dell'infezione e' piu' veloce che fra animali ingabbiati, ma comunque richiede un certo numero di giorni per un contagio completo (Capua 2000). Spesso, solo una sezione di un pollaio e' affetta. Molti uccelli muoiono senza segni premonitori tanto che a volte all'inizo si sospetta avvelentamento (Nakatami 2005). E' necessario notare che un isolato di virus HPAI particolare puo' causare malattia grave in una specie aviaria, ma non in un'altra: nella popolazione di pollame vivo in Hong Kong prima della completa depopolazione del 1997, il 20% dei polli ma solo il 2.5% delle anatre e delle oche era ospite per il virus HPAI H5N1 mentre tutti le altre specie galliformi, passerine e

psitaccine erano virus negative; solamente i polli mostrarono malattia clinica (Shortridge 1998).

In allevamenti di pollame a livello industriale, uno spiccato aumento del consumo di acqua e cibo seguito da un declino progressivo, puo' segnalare la presenza di malattia sistemica in uno stormo. In gruppi di uccelli allevati per la produzione di uova, la cessazione di produzione di uova e' ovvia. Uccelli individuali affetti da HPAI spesso non mostrano altro che apatia grave e' immobilita' (Kwon 2005). Edema, visibile in parti del capo non ricoperte da piume, cianosi della cresta, dei bargigli e delle zampe, diareea verdastra e difficolta' di respiro possono essere presenti in maniera erratica. In uccelli allevati per la produzione di uova, inizialmente si vedono uova con guscio soffice, ma ogni attivita' di deposito cessa rapidamente con la progressione della malattia (Elbers 2005). In specie meno suscettibili, come le anatre, le oche e le griselle il quadro clinico e' dominato da sintomi che affliggono il sistema nervoso tra cui tremori, posture inusuali (torticollis), e problemi di coordimamento (ataxia) (Kwon 2005). Durante un'epidemia in Sassonia, Germania, nel 1979, oche che nuotavano in maniera compulsiva in piccoli cerchi furono fra i primi segni preoccupanti che portarono ad un sospetto di HPAI.

Il quadro clinico dell'influenza aviaria negli esseri umani e' discusso in dettaglio nel capitolo intitolato "Quadro clinico dell'influenza aviaria umana".

Patologia

LPAI

Le lesioni variano con il ceppo virale e con la specie e eta' dell'ospite. In generale, solo tacchine e polli rivelano alterazioni grossolane e microscopiche specialmente con ceppi adattati a questi ospiti (Capua and Mutinelli 2001). Nei tacchini sono state osservate, sinusite, tracheite e airsucculitis, anche se e' possibile che infezioni batteriche possano avere contribuito allo sviluppo di tali lesioni. Nei tacchini e' stata osservata pancreatite. Nei polli, un lieve coinvolgimento del tratto respiratorio e' osservato piu' comunemente. In aggiunta, le lesioni si concentrano negli organi riproduttori degli uccelli allevati per la produzione di uova (ovaie, ovidotto, peritonite del sacco vitellino).

HPAI

Alterazioni grossolane sia patologiche che istopatolgiche del HPAI mostrano una correlazione con quelle elencate per il quadro clinico. Sono state tentativamente postulate quattro classi si alterazioni patologiche;

(i) Forme di malattia peracuta (decesso tra 24-36 ore post infezione, soprattutto presente in specie galliformi) e acuta non rivelano alterazioni patologiche grossolane: un discreto idropericardio, congestione intestinale lieve e occasionalmente sanguinamento petecchioso delle sierose mesenterica e pericardiale e' stato descritto, ma in maniera inconsistente (Mutinelli 2003a, Jones and Swayne 2004). Polli infetti con H5N1 di discendenza asiatica mostrano occasionalmente aree emorragiche e quantita' significative di muco nella trachea

(Elbers 2004). E' possibile anche osservare exudati sierosi nelle cavita' corporali ed edema polmonare. Punti di sanguinamento nella mucosa del proventricolo, che erano spesso descritti nei libri di testo del passato, sono stati riscontrati solamente in occasioni eccezionali in pollame infetto con la discendenza asiatica H5N1 (Elbers 2004). Varie lesioni istologiche insieme alla presenza dell'antigene virale possono essere osservate in vari e diversi organi (Mo 1997). Il virus appare per la prima volta nelle cellule endoteliali. Successivamente, cellule infette con il virus sono osservate nel miocardio, ghiandole adrenali e pancreas. Anche neuroni, cosi' come cellule della glia nel cervello, vengono infettati. Si puo' assumere, patogeneticamente, un decorso simile a quello di virus endoteliotropici, in cui attivazione dell'endotelio e dei leucociti porta ad un rilascio sistematico e non coordinato di citochine che predispongono a fallimento cardiopolmonare o di vari organi contemporaneamente (Feldmann 2000, Klenk 2005).

(ii) in animali che mostrano uno sviluppo di sintomi protratto e un prolungato decorso della malattia, il quadro e' dominato da sintomi neurologici e lesioni del cervello non suppurative (Perkins and Swayne 2002a, Kwon 2005). Tuttavia, il virus puo' venir isolato anche da altri organi. Questo andamento della malattia e' stato descritto in oche, anatre, emu ed altre specie infettate sperimentalmente con ceppi di HPAI H5N1 di discendenza asiatica. In uccelli allevati per la produzione di uova, si puo' osservare infiammazione delle ovaie e degli ovidotti e, dopo rottura del follicolo, la cosiddetta peritonite del sacco vitellino.

(iii) in anatre, gabbiani e passeri di casa, e' stato possibile osservare solamente replicazione virale ristretta. Questi uccelli mostrano lieve polmonite interstiziale, airsacculite e occasionalmente miocardite linfocitica e istiolicitica (Perkins and Swayne 2002a, 2003).

(iv) nell'esperimento descritto da Perkins e Swayne (2003), piccioni e storni risultarono resistenti a infezione con H5N1. Tuttavia Werner at al. sono stati in grado di indurre malattia neurologica protratta, dovuta a encefalite non suppurativa (Klopfleisch 2006), in 5/16 piccioni usando un recente isolato HPAI H5N1 indonesiano.

Diagnosi Differenziale

E' necessario considerare per una diagnosi differenziale di HPAI le seguenti malattie a causa della loro capacita' di provocare uno scoppio improvviso di malattia accompagnato da elevata mortalita' o emostasi in barbigli e creste:

- Malattia velogenica di Newcastle
- Laringotracheite infettiva (polli)
- Peste delle anatre
- Avvelenamento acuto
- Colera acuto negli uccelli acquatici (pasteurellosi) e altre malattie scetticemiche
- Cellulite batterica della cresta e dei barbigli

Forme meno severe di HPAI possono rivelarsi clinicamente anche piu' svianti. Un rapido aiuto diagnostico dal laboratorio e' di conseguenza centrale per decidere ulteriori misure (Elbers 2005).

Diagnosi da laboratorio

Raccolta dei campioni

I campioni devono essere raccolti da numerose carcasse fresche e da uccelli malati presenti in uno stormo. Idealmente un campionamento adeguato e' sostenuto statisticamente e la diagnosi viene fatta sulla base dello stormo. Quando si campionano uccelli sospetti di HPAI, e' necessario osservare standard di sicurezza per evitare l'esposizione del personale che raccoglie campioni ad un HPAIV (Bridges 2002) potenzialmente zooantroponotico. Il CDC ha proposto delle direttive in proposito (CDC 2005).

Per prove virologiche, tamponi ottenuti dalla cloaca e dall'orofaringe, generalmente consentono una investigazione di qualita' nel laboratorio. Il materiale raccolto dai tamponi deve venire disoolto in aliquote da 2-3 ml di un medium di trasporto sterile e isotonico che contiene antibiotici supplementari e una sorgente proteica (ad esempio 0.5% [w/v] albumina di siero bovino, fino al dieci per cento di siero bovino o un' infusione cuore-cervello).

All'autopsia, condotta in condizioni di sicurezza ed evitando la diffusione della malattia (vedi sopra), campioni non conservati di cervello, trachea/polmoni, milza e contenuto intestinale vengono presi per l'isolamento del virus.

Per propositi serologici, bisogna ottenere campioni di sangue nativo. Il numero di campioni ottenuti deve essere sufficente per dimostrare positivita' con un intervallo di confidenza del 95% per un parametro con il 30% di prevalenza.

Trasporto dei campioni

Tamponi, tessuti e sangue devono essere trasportati a bassa temperatura, ma non devono essere congelati. Se si aspettano durante il trasporto ritardi di piu' di 48 ore, questi campioni devono essere congelati e trasportati in ghiaccio secco. In tutti i casi, le regole di sicurezza per il trasporto (ad esempio regole IATA negli Stati Uniti) devono essere osservate con perizia e puntigliosita' per evitare spargimento della malattia ed esposizione accidentale del personale durante il trasporto. E'

altamente consigliabile mettersi in contatto con il laboratorio di destinazione prima di mandare i campioni e, idealmente, perfino prima di raccoglierli.

Cascate diagnostiche

Scoperta diretta di infezioni da AIV

Fondamentalmente, ci sono due linee (parallele) di misurazione diagnostica che provano a (i) isolare e sottotipizzare il virus usando metodi classici (vedi OIE Manual 2005) e (ii) scoprire e caratterizzare il genoma virale molecolarmente.

(i) convenzionalmente, virus AI vengono isolati tramite inoculo di fluidi da un tampone o di omogenati da tessuti in uova di pollo embrionate dai 9 agli 11 giorni di eta', usualmente usando la via del sacco corioallantoideo (Woolcock 2001). A seconda del patotipo, gli embrioni possono morire o non morire entro cinque giorni di osservazione e normalmente non ci sono lesioni caratteristiche osservabili ne' nell'embrione ne' nella membrana allantoidea (Mutinelli 2003b). Uova inoculate con materiale contenente HPAIV normalmente decedono prima di 48 ore. La presenza di un agente emoagglutinizzante puo' essere identificata nel fluido allantoideo. L'emoagglutinazione (HA) e' una tecnica poco sensibile che richiede come minimo $10^{6.0}$ particelle per ml. Se l'inoculo presenta solo una bassa concentrazione di virus, e' possibile che, per certi ceppi LPAIV, siano necessari fino a due ulteriori passaggi in uova embrionate per produrre abbastanza virus che possa essere rilevato via HA.

Isolati emagglutinizzanti sono caratterizzati antigenicamente via test di inibizione dell'emagglutinizzazione (test HI) usando antisieri (mono-) specifici contro i 16 sottotipi H e, come controllo, contro i diversi tipi di paramyxovirus aviario che mostrano anch'essi attivita' di emoagglutinizzazione. Il sottotipo NA puo' essere susseguentemente determinato tramite test di inibizione della neuraminidasi che, ancora una volta, richiedono sieri sottotipio specifici (Aymard 2003). In caso si incontrino isolati di discendenza H5 o H7, bisogna derminare il loro indice di patogenicita' intravenosa (IVPI) per poter distinguere fra biotipi LP e HP (Allan 1977). Questo e' possibile tramite inoculo iv di dieci polli di eta' 6 settimane con il virus isolato cresciuto in uova (0.1 ml di una diluizione 1 a 10 di fluido allantoideo che contiene un titolo HA maggiore di 1 in 16). I polli vengono osservati per un periodo di dieci giorni per sintomi clinici. I risultati vengono integrati in un indice che indica un virus HPAI quando almeno sette su dieci (75%) dei polli inoculati muoiono durante il periodo di osservazione.

Le procedure classiche che abbiamo descritto possono portare a una diagnosi di HPAI entro cinque giorni ma e' possibile che siano necessarie due settimane per eliminare la presenza di AIV. In aggiunta, strumenti diagnostici di alta qualita' (uova SPF, antisieri H- e N- specifici) cosi' come personale esperto sono un prerequisito. Al momento, non ci sono applicazioni di colture cellulari per l'isolamento

di AIV che raggiungono la sensibilita' delle uova di gallina embrionate (Seo 2001).

(ii) un approccio piu' rapido, specialmente quando si cerca di escludere l'infezione, usa tecniche molecolari, che devono seguire anch'esse uno stile a cascata: la presenza di RNA specifici di influenza A e' determinabile tramite la reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) che usa come bersaglio frammenti del gene M, il segmento piu' conservato del genoma del virus dell'influenza (Fouchier 2000, Spackman 2002), o il gene del nucleocapside (Dybkaer 2004).

Quando si ottiene un risultato positivo, e' necessario eseguire RT-PCR che amplificano frammenti del gene dell'emagglutinina dei sottotipi H5 e H7 per determinare la presenza di AIV di nota (Dybkaer 2004, Spackman 2002). Se di nuovo positivo, una diagnosi molecolare del patotipo (LP contro HP) e' possibile dopo aver sequenziato un frammento del gene HA che ricopre il sito di scissione endoproteolitico. Isolati che presentano aminoacidi multipli di tipo basico sono classificati come HPAI. sono in fase di progettazione tecniche di PCR e altre tecniche di DNA per l'identificazione di ceppi H5N1 di discendenza asiatica (Collins 2002, Payungporn 2004, Ng 2005). Sottotipi non H5/H7 possono essere identificati con RT-PCR canonica e una conseguente analisi della sequenza della subunita' HA-2 (Phipps 2004). Esistono anche primers specifici per ogni sottotipo NA. E' possibile ottenere una completa caratterizzazione entro tre giorni, specialmente quando vengono usate tecniche di real time PCR (Perdue 2003, Lee and Suarez 2004). Inoltre, sono al momento in fase di sviluppo DNA chips che dovrebbero ulteriormente ottimizzare la tipizzazione dei virus AI (Li 2001, Kessler 2005). Una diagnosi di esclusione e' possibile entro un solo giorno lavorativo.

Gli svantaggi della diagnosi molecolare stanno nel prezzo che si deve pagare per l'acquisto di consumabili ed equipaggiamento, anche se, quando a disposizione, e' possibile analilzzare molti campioni con meno personale in tempi molto piu' corti rispetto all'isolamento di virus in uova. Tuttavia, bisogna ammettere che ogni PCR o reazione di ibridizzazione, contrariamente all'isolamento del virus nelle uova, contiene un'incertezza intrinseca dovuta alla possibile presenza di mutazioni specifiche in un particolare isolato nei siti di legame dei primer e/o di sonde e che possono rendere il test un falso negativo.

Quindi una combinazione di metodi molecolari (ad esempio per avere uno screening) e classici (ad esempio per una caratterizzazione finale degli isolati e una conferma della diagnosi di un caso all'indice) possono essere utili per controbilanciare gli svantaggi dei due principi.

Sono state disegnate prove rapide per scoprire antigeni virali in tissue impression smears (strisci per impronta diretta) e in sezioni al criostato usando immunofluorescenza, o usando il saggio di cattura di antigene legato ad un enzima

(ELISA) e sistemi dip stick a flusso laterale per fluidi di tamponi dip-stick. Fin'ora queste tecniche si sono rivelate meno sensibili sia dell'isolamento del virus che della PCR, e per questo motivo sono difficili da approvare per una diagnosi che sia giuridicamente vincolante, specialmente in un caso all'indice (Davison 1998, Selleck 2003, Cattoli 2004). L'uso di pen side tests nel campo della veterinaria e' ancora nella fase iniziale e richiede ulteriore sviluppo.

Diagnosi indiretta di infezioni AIV

E' possibile che la serologia a livello di gruppo sia utile per propositi di controllo (Beck 2003). Per l'individuazione di anticorpi specifici AIV in campioni di siero di uccello, o in rossi d'uovo in caso di stormi di uccelli allevati per la produzione di uova, il saggio di inibizione dell'emagglutinina (HI) che usa antigeni di referenza per il sottotipo rappresenta a tutt'oggi lo standard migliore. Anticorpi gruppo-specifici (virus dell'influenza tipo A) diretti contro la proteina del nucleocapside possono essere identificati anche usando immunoprecipitazione in gel di agar e tramite saggio ELISA (Meulemans 1987, Snyder 1985, Jin 2004). ELISA in formato competitivo permettono l'analisi di sieri di tutte le specie di uccelli, indipendentemente dalla disponibilita' di coniugati specie-specifici (Shafer 1998, Zhou 1998). E' stato riportato un formato ELISA per l'identificazione di anticorpi H7-specifici (Sala 2003), ma al momento non c'e' nessun saggio che identifichi anticorpi H-5 specifici in sieri aviari.

Le cinetiche degli anticorpi sottotipo-specifici dipendono dalle caratteristiche del ceppo virale e, primariamente, dalla specie ospite. In uccelli gallinacei, anticorpi AIV-specifici diventano identificabili in maniera soddisfacente durante la seconda settimana che segue l'esposizione; anticorpi ne tuorlo sono identificabili dopo un ritardo di alcuni giorni (Beck 2003). La produzione e identificazione di anticorpi nelle specie Anatidae sono sottoposte a molte piu' variazioni (Suarez and Shultz-Cherry 2000).

Trasmissione

Trasmissione fra uccelli

Virus dell'influenza aviaria a bassa patogenicita' circolano in maniera geneticamente stabile negli uccelli acquatici (Webster 1992). Il ciclo di infezione tra gli uccelli dipende dalla catene di trasmissione orofecale. Oltre alla trasmissione diretta da ospite ad ospite, lo spargimento indiretto tramite acqua e fomiti contaminati dal virus e' una via importante, contrariamente a quanto avviene nelle infezioni da virus dell'influenza in mammiferi (umani, suini e cavalli) in cui e' prevalente la trasmissione via areosol. Negli uccelli, sono stati misurati titoli massimi di secrezione fino a 108.7 x 50 % della dose uovo-infettiva (EID50) per grammo di feci (Webster 1978). Titoli medi saranno decisamente piu' bassi. I virus aviari dell'influenza ritengono una capacita' sorprendente di infettivita' nell'ambiente e in particolare in acque superficiali nonostante la loro morfologia apparentemente delicata (Stallknecht 1990a+b, Lu 2003). Sospensioni di virus in acqua hanno mostrato di ritenere infettivita' per piu' di 100 giorni a 17°C. Al di sotto dei -50°C il virus puo' essere conservato indefinitivamente. Dati forniti da Ito et al. (1995) e da Okazaki et al. (2000) hanno evidenziato che nelle regioni paleartiche, i virus dell'influenza aviaria si conservano in laghi gelati durante

l'inverno nell'assenza dei loro ospiti naturali migratori. Quando ritornano nella stagione successiva per la riproduzione, gli uccelli o la loro prole (suscettibile) vengono re-infetti con il virus rilasciato per caso dai ghiacci ambientali che si sciolgono. A questo proposito e' stato ipotetizzato che i virus dell'influenza possono essere conservati nel ghiaccio presente nell'ambiente per lunghi periodi (Smith 2004), e che virus e genotipi antichi potrebbero essere riciclati da questo bacino (Rogers 2004).

L'introduzione di sottotipi H5 o H7 di virus LPAI in stormi di pollame suscettibili e' la base di una catena di eventi infettivi che puo' risultare nello sviluppo de novo di biotipi altamente patogenici. Il rischio che l'infezione venga trasmessa da uccelli selvatici a pollame domestico e' maggiore quando gli uccelli domestici circolano liberamente, condividono fonti acquatiche con uccelli selvatici, o utilizzano rifornimenti di acqua o di cibo che possono essere stati contaminati con escrementi di uccelli selvatici infetti e portatori del virus (Capua 2003, Henzler 2003). Gli uccelli sono infettati tramite contatto diretto con animali che secernono il virus e con le loro secrezioni o tramite contatto con vettori (abiotici) che sono contaminati con materiale che contiene il virus. Una volta introdotto in gruppi di uccelli domestici, LPAIV possono o no avere bisogno di una fase di adattamento alle specie di pollame prima di venir secreti in quantita' sufficienti da assicurare una costante trasmissione orizzontale tra e fra gruppi di uccelli. HPAIV, una volta sorti da gruppi infetti da LPAIV, si distribuiscono in maniera simile. Mercati cosiddetti "wet" in cui uccelli vivi vengono venduti in condizioni di affollamento sono moltiplicatori della distribuzione (Shortridge 1998, Bulaga 2003).

Misure di biosicurezza, che hanno lo scopo di isolare grandi allevamenti di pollame, prevengono in maniera effettiva la trasmissione meccanica da allevameto ad allevamento, tramite ad esempio equipaggiamento, mezzi di trasporto, mangime, gabbie, o indumenti – specialmente scarpe – contaminati. Un'analisi dell'epizootica HPAI italiana nel 1999/2000 rivelo' i seguenti rischi di trasmissione: spostamento di gruppi di uccelli infetti (1,0%), contatti mediati durante il trasporto di pollame a macelli (8.5%), vicinanza a luoghi infetti entro un raggio di un chilometro (26.2%), camion usati per il trasporto di mangime, lettiere o carcasse (21.3%), altri contati indiretti tramite scambio di lavoratori degli allevamenti, macchinari ecc. (9.4%) (Marangon and Capua 2005). Non ci furono suggerimenti di una distribuzione aerogenica durante l'epizootica italiana. Tuttavia, durante epidemie in Olanda (2003) e in Canada (2004), la distribuzione per via aerea e' stata considerata (Landman and Schrier 2004, Lees 2004). Il ruolo di vettori come roditori o mosche, che potrebbero agire come "vettori meccanici" e non sono loro stessi infetti, e' per la maggior parte indeterminatto ma non costituisce certamente uno dei fattori di maggior importanza.

Fino all'emergenza della discendenza asiatica H5N1 HPAIV, non ci fu un ruolo significativo nella reintroduzione di HPAIV nella popolazione di uccelli selvatici da parte del pollame. Nell'aprile del 2005, tuttavia, malattia associata a H5N1 di discendenza asiatica venne alla luce a Lake Qinghai nella Cina nord occidentale che colpi' migliaia di oche calve e altre specie di anatre migratorie, cormorani e gabbiani (Chen 2005, Liu 2005). Quindi, la trasmissione di virus H5N1 di discendenza asiatica da parte di uccelli selvatici deve essere presa in considerazione in futuri concetti preventivi (discussi in seguito).

Fino al tardo 2003, certi virus H5N1 altamente patogenici vennero rilevati in Asia per polli ma non per le anatre (Sturm-Ramirez 2005). Infezioni sperimentali che hanno usato questi isolati hanno rivelato una mistura eterogenea per quanto riguarda l'analisi genetica e la capacita' di formare placche in colture cellulari (Hulse Post 2005). Anatre in grado di sopravvivere all'infezione con questi isolati mostrarono di essere in grado di rilasciare una popolazione virale al diciassettesimo giorno che aveva perduto il potenziale patogenico per le anatre. Quando si usano segni clinici per accertare la presenza di HPAIV H5N1 nell'ambiente, le anatre potrebbero diventare il "cavallo di Troia" per questo virus (Webster 2006).

Trasmissione agli esseri umani

La trasmissione del virus aviario dell'influenza agli esseri umani, che porta allo sviluppo di evidente malattia clinica e' un evento raro (Tavola 3). Data la potenziale esposizione di milioni di persone a HPAIV H5N1 nel sud est asiatico, il numero di casi umani effettivamente documentato, sebbene in costante aumento durante gli anni del recente passato, deve essere considerato come relativamente basso (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en).

Tavola 3. Infezioni umane con virus aviario dell'influenza documentate*

Data	Paese/Area	Ceppo	Casi (Decessi)	Sintomi	Origine
1959	USA	H7N7**	1	Respiratori	Viaggi all'estero
1995	UK	H7N7	1	Congiuntivite	Anatre domestiche (che condividevano un lago con uccelli migratori)
1997	Hong Kong	H5N1**	18 (6)	Respiratori/ polmonite	Pollame
1998	Cina (Guangdong)	H9N2	5	Ignoti	Ignota
1999	Hong Kong	H9N2	2	Respiratori	Pollame; ignota
2003 (Feb.)	Hong Kong	H5N1**	2 (1)	Respiratori	Ignota
2003 (Mar.)	Paesi Bassi	H7N7**	89 (1)	Congiuntivite (polmonite, insufficienza respiratoria nel caso di decesso	Pollame
2003 (Dic.)	Hong Kong	H9N2	1	Respiratori	Ignota
2003	New York	H7N2	1	Respiratori	Ignota
2003	Vietnam	H5N1**	3 (3)	Respiratori	Pollame
2004	Vietnam	H5N1**	29 (20)	Respiratori	Pollame
2004	Tailandia	H5N1**	17 (12)	Respiratori	Pollame
2004	Canada	H7N3**	2	Congiuntivite	Pollame
2005	Vietnam	H5N1**	61 (19)	Respiratori	Pollame
2005	Tailandia	H5N1**	5 (2)	Respiratori	Pollame
2005	Cina	H5N1**	7 (3)	Respiratori	Pollame

2005	Cambogia	H5N1**	4 (4)	Respiratori	Pollame
2005	Indonesia	H5N1**	16 (11)	Respiratori	Pollame
2006	Turchia	H5N1**	3 (3)	Respiratori	Pollame

* Referenza: Avian influenza - assessing the pandemic threat. WHO, http://www.who.int/csr/disease/influenza/WHO_CDS_2005_29/en/, accessed 06 January 2006.
** Altamente patogenico per il pollame

La prima associazione della discendenza asiatica HPAIV H5N1 con malattie respiratorie in esseri umani venne osservata in Hong Kong nel 1997, quando sei su 18 casi umani infetti con H5N1 morirono. Questi casi vennero collegati epidemiologicamente con un'epidemia di H5N1 altamente patogenico in mercati di uccelli vivi (Yuen 1998, Claas 1998, Katz 1999). Il rischio di trasmissione deretta del virus H5N1 da uccelli ad esseri umani sembra essere maggiore nelle persone che hanno contatto ravvicinato con pollame vivo infetto, o con superfici e oggetti altamente contaminati con i loro escrementi. Il rischio di esposizione e' considerato sostanziale durante il macello, lo spiumamento, la separazione delle parti e la preparazione di pollame per scopi alimentari (http://www.who.int/csr/don/2005_08_18/en/). La discendenza asiatica del virus HPAIV H5N1 puo' essere rivelata in tutti i tessuti – inclusa la carne – nella carcassa dell'uccello. In molti casi, e' stato riportato che la persona che aveva ucciso o preparato un uccello malato per scopi alimentari aveva sviluppato malattia mortale, mentre i membri della famiglia che avevano partecipato al pranzo no (http://www.who.int/csr/don/2005_10_13/en/index.html).

Un ceppo H9N2 fu la causa di sintomi lievi tipo influenza in due bambini in Hong Kong affetti da SAR nel 1999, e in un bambino nel dicembre 2003 (Saito 2001, Butt 2005).

Il ceppo H9N2 che circolava nel pollame negli stessi periodi provoco' sintomi significativi e alta frequenza di mortalita' in specie altamente vulnerabili come i tacchini e i polli.

Al momento non c'e' evidenza che carni di pollame ben cotti o prodotti del pollame siano una sorgente di infezione per la discendenza asiatica H5N1. Come regola generale, il WHO raccomanda che le carni siano ben cotte, in modo che tutte le parti raggiungano una temperatura interna di 70°C. A questa temperatura, i virus dell'influenza sono inattivati, e di conseguenza carne cruda contaminata dal virus H5N1 e' resa sicura (WHO 2005).

Trasmissione ad altri mammiferi

I virus dell'influenza aviaria sono stati trasmessi a svariate specie di mammiferi in varie occasioni. In questo caso, in seguito a cicli di replicazione ed adattamento, e' possibile la formazione di nuove discendenze epidemiche. I maiali, in particolare, sono stati coinvolti frequentemente in tali "trasversioni fra classi". Nelle popolazioni suine europee, virus H1N1 simili a virus aviari sono altamente prevalenti (Heinen 2002) e un virus H1N2, un virus di riassortimento umano-aviario, isolato in prima istanza nel Regno Unito nel 1992, sta diventando sempre

piu' piu' stabilito (Brown 1998). Negli Stati Uniti, circola un riassortante triplo (H3N2) fra il classico H1N1, l'H3N2 umano e sottotipi aviari (Olsen 2002). Altri sottotipi presumibilmente di origine aviaria (ad esempio H1N7, H4N6) sono stati rivelati, sostanzialmente in maniera aneddotica, in suini (Brown 1997, Karasin 2000). Un virus H9N2 di provenienza aviaria e' moderatamente prevalente in popolazioni suine della Cina orientale (Xu 2004). In aggiunta ai suini, mammiferi marini e cavalli hanno mostrato la capacita' di acquisire virus A dell'influenza da sorgenti aviaire (Guo 1992, Ito 1999).

Infezioni naturali con H5N1 sono state descritte in tigri e altri grandi felini in uno zoo in Tailandia dopo aver usato carcasse di pollo infetto per cibare gli animali (Keawcharoen 2004, Quirk 2004, Amosin 2005). Gli animali soffrirono di grave malattia con alta mortalita'. Apparentemente e' capitata anche trasmissione da felino a felino nello stesso zoo (Thanawongnuwech 2005). Questa fu il primo resoconto di infezione con il virus dell'influenza in Felidae. Gatti domestici europei a pelo corto possono essere infettati sperimentalmente con il virus H5N1 (Kuiken 2004).

Nel 2004, 3,000 campioni di siero ottenuti da maiali in Vietnam liberi di circolare vennero esaminati sierologicamente per evidenza ad esposizione al virus H5N1 dell'influenza (Choi 2005). Prove di neutralizzazione del virus e analisi Western blot confermarono che solamente ilo 0.25% dei campioni erano sieropositivi. In infezioni sperimentali, e' stato dimostrato che i maiali possono essere infettati con virus H5N1 isolati in Asia nel 2004 da sorgenti umane e aviarie. I soli sintomi rivelati per quattro giorni dopo l'infezione furono una lieve tosse e elevata temperatoura corporea. Fu possibile isolare il virus da tessuti dell'alto tratto respiratorio per almeno 6 giorni. Titoli virali massimi da tamponi nasali vennero rilevati nel secondo giorno dopo l'infezione, ma nessuno degli animali infettati sperimentalmente fu in grado di trasmettere il virus ad altri maiali con cui ebbero contatto. I virus altamente letali H5N1 che circolano in Asia sembrano in grado di infettare i maiali per vie naturali. Tuttavia, l'incidenza di tali infezioni sembra che sia relativamente bassa. Nessuno dei virus H5N1 umani e aviari esaminati viene facilmente passato fra maiali in condizioni sperimentali (Choi 2005). Sulla base di queste osservazioni, e' probabile che i maiali non siano al momneto importanti nell'epidemiologia della discendenza asiatica dell'H5N1.

Un'epidemia nei Paesi Bassi, in Belgio e in Germania del virus aviario dell'influenza altamente patogenico H7N7 in pollame nella primavera del 2003, causo' infezione e lieve malattia, prevalentemente congiuntivite, in 89 lavoratori dell'industria che furono esposti a carcasse e animali infetti (Koopmans 2004). L'infezione di un veterinario causo' una sindrome acuta di stress respiratorio ed ebbe decorso fatale (Fouchier 2004). In aggiunta, durante l'epidemia olandese, venne confermato sia serologicamente che virologicamente che l'infezione H7N7 si verifico' in famigliari che ebbero contatto con l'ammalato, quattro dei quali mostrarono congiuntivite (Du Ry van Beest Holle 2005). E' stata anche riportata evidenza per infezione (asintomatica) naturale con ceppi LPAIV di sottotipo H9, H7 e H5 in esseri umani in altre occasioni in Italia e in Giappone (Zhou 1996, Puzelli 2005, Promed 20060110.0090).

In un rapporto aneddotico (Promed Mail 20050826), venne riportata un'infezione fatale doviuta a influenza H5N1 in tre rari civet cats nati in cattivita' in un parco nazionale del Vietnam. La sorgente dell'infezione rimane oscura. Altri 20 gatti civette della stessa specie, in gabbie adiacenti non si ammalarono.

Non sono stati mai trovati virus aviari dell'influenza in ratti, conigli e altri mammiferi normalmente presenti in mercati in cui si vendono uccelli vivi in Hong Kong dove il 20% dei polli risultarono positivi per la discendenza asiatica dell'H5N1 (Shortridge 1998).

Epidemiologia

Pollame

Fino alla fine del 2003, HPAIV e'stata considerata una rara malattia nel pollame. Dal 1959, solo 24 epidemie primarie sono state riportate a livello mondiale (Tavola 1). La maggior parte di queste occorsero in Europa e nelle Americhe. La maggior parte delle epidemie furono limitate geograficamente, con solo cinque che risultarono in una diffusione significativa a numerosi allevamenti, e con solo una che si diffuse internazionalmente. Nessuna delle epidemie raggiunse le dimensioni delle epidemie asiatiche di H5N1 del 2004 (WHO 2004/03/02). A tutt'oggi, tutte le epidemie della forma altamente patogenica sono stati causati da virus A dell'influenza sottotipo H5 e H7.

Nelle epidemie precedenti, commercio illegale o spostamento di uccelli vivi infetti o dei loro prodotti non processati, e passaggio non intenzionale meccanico di virus attraverso spostamenti umani (viaggiatori, profughi ecc.) sono stati la causa maggiore nella diffusione di HPAIV.

Una nuova dimensione nelle epidemie di HPAIV divenne evidente nel tardo 2003. Dalla meta' del dicembre 2003 fino all'inizio del febbraio 2004, epidemie nel pollame causate dai virus di discendenza asiatica HPAI H5N1 vennero riportati in Corea, Vietnam, Giappone, Tailandia, Cambogia, Repubblica Popolare Democratica del Laos, Indonesia e Cina. L'occorrenza simultanea in svariati paesi di maggiori epidemie di influenza H5N1 altamente patogenica in pollame domestico non ha precedenti. Tutti gli sforzi diretti a contenere la malattia sono fin'ora risultati inutili. Nonostante la mattatoia e la distruzione preventiva di qualcosa come 150 milioni di uccelli, l'H5N1 e' ormai considerato endemico in molte aree dell'Indonesia e del Vietnam e in certe zone di Cambogia, Cina, Tailandia, e possibilmente anche la Repubblica Popolare Democratica del Laos.

Il virus originale, rilevato per la prima volta nel 1997, era di parentaggio riassortante, e includeva almeno un virus H5N1 di oca domestica A/goose/Guangdong/1/96, che ha donato l'HA) e un virus H6N1, probabilmente derivato da alzavole (A/teal/Hong Kong/W312/97, che ha donato l'NA e i segmenti per le proteine interne), che e' passato attraverso molti cicli di riassortimento con altri virus di influenza aviaria sconosciuti (Xu 1999, Hoffmann 2000, Guan 2002b). Sono stati descritti numerosi e diversi genotipi della discendenza H5N1 (Cauthen 2000, Guan 2002a+2003). Il cosiddetto genotipo "Z" ha dominato le epidemie fin dal dicembre 2003 (Li 2004).

Nell'aprile del 2005, fu raggiunto ancora un nuovo livello dell'epizootica, quando, per la prima volta, il ceppo H5N1 ottenne accesso su grande scala a popolazioni di uccelli selvatici (Chen 2005, Liu 2005). Nel lago Qinghai nella Cina nord occidentale migliaia di oche calve, una specie migratoria, fu colpita dall'infezione. Parecchie specie di gabbiano cosi' come cormorani furono anche vittime in questa

localita'. Quando, nell'estate e al'inizio dell'autunno del 2005, epidemie di H5N1 vennero riportate per la prima volta nelle zone geograficamente adiacenti della Mongolia, Kazakhstan e Siberia meridionale, si sospettarono gli uccelli migratori per la diffusione del virus. Ulteriori epidemie, lungo e fra le rotte migratorie sovrapposte dall'Asia interiore verso il Medio Oriente e l'Africa, colpirono la Turchia, Romania, Croazia e la penisola della Crimea nel tardo 2005. In tutti i casi (con l'eccezione di quelli in Mongolia e Croazia) sia il pollame che uccelli acquatici selvatici furono colpiti. Spesso, i casi all'indice nel pollame sembrarono associati a prossimita' con laghi e paludi abitati da uccelli acquatici selvatici. Mentre questo sembra suggerire un sospetto definitivo verso gli uccelli selvatici nello spargimento del virus, bisogna notare che il virus di discendenza asiatica HPAI H5N1 e' stato trovato solo in uccelli acquatici selvatici moribondi o deceduti. Il vero stato dell'H5N1 nelle popolazioni di uccelli acquatici selvatici e il loro ruolo nella diffusione dell'infezione rimane enigmatico. Al momento, si puo' solamente speculare se gli uccelli acquatici selvatici possono trasportare il virus lungo grandi distanze durante il periodo di incubazione o se certe specie rimangono mobili nonostante l'infezione con H5N1.

Nel frattempo, tuttavia, studi in Cina hanno rivelato la presenza di ulteriori nuovi genotipi del virus H5N1 di discendenza asiatica in tre passeri (Kou 2005). Nessuno dei passeri da cui il virus e' stato isolato, ne' le anatre infettate sperimentalmente con questi virus, mostrarono sintomi. Tuttavia, una completa HPAI si sviluppo'quando i virus vennero trasmessi a polli. Dal momento che numerosi passeri dello stesso stormo si rivelarono carrier di genotipi diversi distinguibili, che probabilmente sono il risultato di riassortimenti con diversi virus AI di provenienza ignota, fu sospettato che la trasmissione dei virus di tipo H5N1 avvenne in questi uccelli qualche tempo (mesi?) prima. Questi dati segnano un altro passo che aggrava la situazione: i passeri, a causa del loro habitat, sono mediatori ideali fra uccelli selvatici e pollame domestico e' possono trasportare virus HPAI tra queste proplazioni. Infezioni di HP H5N1 ristrette localmente in passeri individuali (malati o deceduti) e' stata riportata anche in Tailandia e Hong Kong. L'endemicita' di HPAIV in passeracei, come passeri, rondini e storni che vivono in prossimita' di aree residenziali non solo comporterebbero un'enorme pressione sull'industria del pollame, ma incrementerebbero anche il rischio di esposizione per gli esseri umani (Nestorowicz 1987).

Casi umani

Fino al 30 dicembre 2005, sono stati riportati 142 casi di H5N1 in esseri umani. L'epidemia umana e' fin'ora limitata a Cambogia, Indonesia, Tailandia con epicentro nel Vietnam (65.5% di tutti i casi). 72 (50.7%) persone sono decedute.

Per una maggiore e dettagliata informazione vedere il capitolo intitolato "Epidemiologia".

Conseguenze economiche

Epidemie di influenza aviaria altamente patogenica possono essere catastrofiche sia per singoli allevatori che per l'industria del pollame della regione colpita (vedi Tavola 1). Perdite economiche sono normalmente solamente in parte dovute direttamente alla morte del pollame a causa di infezione con HPAIV. Le misure che

vengono adottate per prevenire ulteriore diffusione della malattia esercitano un costo pesante. Ugualmente devastanti sono le conseguenze nutrizionali in paesi in via di sviluppo in cui il pollame e' un'importante fonte di proteine animali. Una volta che le epidemie diventano diffuse, e' difficile controllarle e il controllo di tali epidemie puo' richiedere anni (WHO 2004/01/22).

Misure di controllo contro HPAI

A causa del suo potenziale impatto devastante dal punto di vista economico, l'HPAI e' soggetto a una vigile supervisione e a stretta legislazione a livello mondiale (Pearson 2003, OIE Terrestrial Animal Health Code 2005). Le misure da prendere contro l'HPAI dipendono dalla situazione epidemiologica della zona colpita. Nella comunita' europea (EU) dove l'HPAI non e' endemica, la vaccinazione profilattica contro l'influenza aviaria e' generalmente proibita. Quindi, e' possibile che si verfichino epidemie cospique di HPAI nel pollame a causa del corso clinico devastante della malattia. Di conseguenza, quando di fronte a tali epidemie, vengono prese misure di controllo aggressive come l'eliminazione di allevamenti affetti e con la possibilita' di contatto che puntano alla radicale eliminazione dei virus HPAI e a contenere l'epidemia nell'allevamento all'indice.

Per questo scopo, vengono erette zone di controllo e sorveglianza intorno al caso all'indice con diametro che varia da nazione a nazione (da 3 a 10 chilometri rispettivamente nell'EU). Misure standard di controllo per la prevenzione della diffusione laterale ad altri allevamenti comprendono la quarantina di allevamenti infetti e con potenziale di contatto, rapida mattanza di tutti gli uccelli affetti o esposti al virus e un'appropriata eliminazione delle carcasse (OIE - Terrestrial Animal Health Code). E' fondamentale che il movimento di pollame vivo e anche, possibilmente, di prodotti del pollame, sia all'interno che fra nazioni, siano limitati durante le epidemie.

In aggiunta, il controllo dei sottotipi LPAI H5 e H7 nel pollame, tramite esame e mattanza degli allevamenti con infezione acuta, puo' essere consigliabile in aree non endemiche per ridurre il rischio di uno sviluppo *de novo* di HPAIV da tali allevamenti.

Questo concetto di eradicazione puo' generare problemi specifici in aree (i) con un'alta densita' di pollame (Marangon 2004, Stegemann 2004, Mannelli 2005) e (ii) dove prevalgono piccoli allevamenti da cortile con pollame libero di circolare (Witt and Malone 2005). A causa della prossimita' di allevamenti di pollame con le strutture dell'industria, la diffusione della malattia e' piu' veloce delle misure di eradicazione. Di conseguenza, durante l'epidemia italiana del 1999/2000 non solo vennero distrutti allevamenti infetti o con potenzialita' di contatto, ma vennero uccisi in maniera preventiva anche gruppi di uccelli nel raggi di un chilometro dall'allevamento infetto. Nonostante tutto, l'eradicazione richiese quattro mesi e l'uccisione di 13 milioni di uccelli (Capua 2003). La creazione di zone di contenimento da uno a svariati chilometri intorno ad allevamenti infetti completamente deprivati di pollame fu anche responsabile per l'eradicazione totale del HPAIV nei Paesi Bassi nel 2003 e in Canada nel 2004. Di conseguenza non solo la stessa malattia, ma anche la mattanza preventiva di animali porto' alla perdita di 30 e 19 milioni di uccelli, rispettivamente. Nel 1997, le autorita' di Hong Kong ordinarono la mattanza dell'intera popolazione del pollame entro tre giorni (il 29, 30

e 31 dicembre; 1.5 milioni di uccelli). L'applicazione di tali misure, dirette all'eliminazione immediata di HPAIV al costo dell'eliminazione anche di animali non infetti, puo' essere ragionevole in allevamenti commerciali e in contesti urbani. Tuttavia, questo avra' conseguenze significative per l'industria del pollame cosi' come solleva implicazioni etiche e preoccupazioni da parte del pubblico contro la mattanza di milioni di animali sani e non colpiti dal virus nelle zone di contenimento.

Tali misure sono molto difficili da implementare in aree rurali con forme di allevamento del pollame tradizionale in cui polli e anatre circolano liberamente e incontrano uccelli selvatici o condividono con essi fonti d'acqua. In aggiunta, anatre domestiche attraggono le anatre selvatiche e consentono la formazione di un punto di collegamento significativo nella catena di trasmissione fra stormi selvatici e gruppi di uccelli domestici (WHO 2005). Queste circostanze possono provvedere la base che permette ai virus HPAI di raggiungere lo stato endemico.

La presenza di HPAI a livello endemico in certe regioni impone una pressione costante sugli allevamenti del pollame. Le restrizioni menzionate in precedenza non possono essere mantenute per periodi lunghi senza provocare grande danno all'industria del pollame nazionale o, nei paesi in via di sviluppo, portare ad una seria mancanza di risorse proteiche per la popolazione. Di conseguenza e' necessario adottare altre misure per il contenimento della malattia.

La vaccinazione e' stata usata largamente in queste circostanze e potrebbe anche essere uno strumento supplementare nei processi di eradicazione in aree non endemiche.

Vaccinazione

La vaccinazione in veterinaria ha quattro scopi diversi: (i) protezione da malattia clinica, (ii) protezione da infezione con virus virulento, (iii) prevenzione dell'escrezione di virus e, (iv) differenziazione sierologica di animali infetti da animali vaccinati (**d**ifferentiation of **i**nfected from **v**accinated **a**nimals cosiddetto principio DIVA).

Nel campo della vaccinazione contro l'influenza nessun vaccino, ne' commerciale ne' sperimentale, e' in grado di presentare tutti e quattro questi requisiti (Lee and Suarez 2005). Il primo scopo, la protezione da malattia clinica da HPAIV, e' ottenibile dalla maggioranza dei vaccini. Il rischio di infezione deglli animali vaccinati con, e la secrezione di, virus virulento selvatico e' normalmente ridotta ma non completamente eliminata. Questo puo' provocare un problema epidemiologico significativo in aree endemiche in cui viene praticata vaccinazione su larga scala: uccelli vaccinati che sembrano sani possono essere infetti e secernere il virus ambientale "sotto la protezione" del vaccino. L'efficacia della riduzione della secrezione del virus e' importante per lo scopo principale delle misure di controllo, cioe' l'eradicazione del virus ambientale virulento. L'efficacia puo' essere misurata tramite il fattore di replicazione r0. Se si assume che un gruppo di uccelli infetto e vaccinato passi l'infezione, in media, a meno di un'altro gruppo ($r0 < 1$), il virus virulento e', su basi matematiche, prono all'estinzione (van der Goot 2005). Quando si ha a che fare con la vaccinazione contro il virus potenzialmente zoonotico H5N1, la riduzione dell'escrezione del virus riduce anche il rischio di trasmissione ad esseri umani, visto che sembra necessaria una notevole dose di virus per passare la

barriera della specie fra uccelli ed esseri umani. Infine, ma non meno importante, la tecnica DIVA permette di seguire la traccia delle infezioni da virus ambientale anche in uccelli vaccinati per via sierologica.

Per l'uso pratico bisogna osservare certi requisiti (Lee and Suarez 2005):

- vista la potenzialita' di riassortimento genetico cosi' come, nel caso di sottotipi H5- e H7-, un rischio di mutazioni spontanee che portano ad aumentata patogenicita', i vaccini non devono essere composti da virus dell'influenza competenti per la replicazione. Di conseguenza vaccini con virus vivo ed attenuato sono obsoleti.
- La protezione contro HPAI nel pollame dipende in grande misura da anticorpi HA-specifici. Di conseguenza, i virus usati per il vaccino devono appartenere allo stesso sottotipo H del virus presente nell'ambiente. Una concordanza ideale di virus ambientale e virus del vaccino, come richiesto nel caso di vaccino umano, non e' necessaria per il vaccino del pollame. L'introduzione di immunita' incrociata omosottotipica nel pollame puo' essere sufficiente per la protezione, per fatto che correntemente c'e' una mancanza di antigenic drift dovuto al vaccino nei virus aviari dell'influenza, a causa dell'assenza di vaccinazione diffusa.
- Una strategia marker (DIVA) sembra essenziale (Suarez 2005). Alternativamente e' possibile usare uccelli sentinella non vaccinati per seguire la malattia.

E' stata sviluppata tutta una serie di diversi concetti per il vaccino. La maggior parte dei vaccini sono ancora fondati su virus inattivato con adiuvante che richiedono l'applicazione tramite ago e siringa per ogni singolo animale.

Vaccini omologhi inattivati, fondati sul ceppo corrente di HPAI, inducono una protezione appropriata, ma non permettono una distinzione serologica fra uccelli infetti e uccelli vaccinati. Dal momento che il vaccino e' formulato sul virus HPAI corrente, c'e un ritardo inerente prima che il vaccino possa essere utilizzato.

Al contrario, vaccini inattivati eterologhi, possono essere utilizzati come vaccini marker quando il virus del vaccino esprime lo stesso sottotipo HA- ma diverso sottotipo NA- quando confrontato con il virus nell'ambiente (ad esempio vaccino H5N9 contro HPAI H5N2). Tramite rilevazione via anticorpi specifici per il sottotipo NA, uccelli infetti e vaccinati sono distinguibili (Cattoli 2003). Tuttavia, questi metodi sono laboriosi e possono mostrare una certa mancanza di sensibilita'. Cio' nonostante, questi vaccini possono essere mantenuti in banche di vaccini che comprendono vari sottotipi H5 e H7 con sottotipi NA discordanti. Un grande aiuto nella produzione di vaccini sia per uso medico che veterinario, sara' fornito dallo sviluppo della reverse genetics che potra' provvedere combinazioni HxNy con background genetico favorevole (Liu 2003, Neumann 2003, Subbarao 2003, Lee 2004, Chen 2005, Stech 2005). Al momento vaccini eterologhi inattivati sono in uso nei focolai di H5N1 del sud est asiatico cosi come in Messico, Pakistan e nel nord Italia (e.g. Garcia 1998, Swayne 2001). Come sistema DIVA alternativo da usare nei vaccini inattivati, e' stata proposta la rivelazione di anticorpi specifici NS-1 (Tumpey 2005). Questi anticorpi sono generati con titoli alti in uccelli naturalmente infetti, ma con titoli considerevolmente piu' bassi quando vengono usati vaccini inattivati.

Vaccini ricombinanti che usano vettori vivi ingenierizzati esprimono un gene HA H5 o H7 in uno scheletro di virus o batteri in grado di infettare specie di pollame (ad esempio virus del vaiolo degli uccelli acquatici [Beard 1991, Swayne 1997+2000c], virus della laringotracheite [Lueschow 2001, Veits 2003], o virus della malattia di Newcastle [Swayne 2003] fra gli altri). Essendo vaccini vivi, e' possibile un'applicazione in massa tramite acqua o spray. Anche se permette una chiara distinzione basata su DIVA, immunita' preesistente al vettore, tuttavia, puo' interferire largamente sul successo della vaccinazione. Una certa esperienza sul campo con ricombinanti del virus del vaiolo degli uccelli acquatici e' stata ottenuta in Messico e negli Stati Uniti.

Infine, e' stato sperimentalmente dimostrato un certo successo nell'uso di proteine ricombinanti HA e nell'uso di vaccinazione via DNA tramite plasmidi che esprimono proteine HA (Crawford 1999, Kodihalli 1997).

Numerose nazioni del sud est asiatico stanno pianificando l'uso della vaccinazione a livello nazionale (Normile 2005).

Rischio di pandemie

E' necessario che si verifichino tre condizioni perche' una nuova pandemia possa incominciare:

- Un virus sottotipo HA dell'influenza, assente nella popolazione umana per almeno una generazione emerge (o riemerge) *e*
- Infetta e si replica efficientemente negli esseri umani *e*
- Si diffonde facilmente e in maniera continua fra gli esseri umani

Questo dimostra che la minaccia di una nuova pandemia influenzale umana non e' unicamente legato all'emergenza di HPAI H5N1. Fin'ora H5N1 incontra solo due di queste condizioni: e', per la maggior parte della popolazione umana, un nuovo sottotipo ed ha infettato e causato grave malattia e alta mortalita' in piu' di 140 esseri umani a tutt'oggi. Non esiste, nella maggior parte della popolazione umana, immunita' contro virus tipo H5N1. Saremmo sull'orlo di una pandemia se la discendenza asiatica di H5N1 dovesse acquisire, tramite adattamenti incrementali o tramite riassortimento con un virus gia' adattato agli esseri umani, le proprieta' che consentono una trasmissione da essere umano ad essere umano efficiente e mantenuta nel tempo (Guan 2004).

E' stato dimorstrato in vitro che due cambi simultanei di amminoacidi nella proteina HA dell' HPAIV H5N1 (Q226L e G2285) nel sito di legame al recettore ottimizzano il legame ai recettori umani tipo 2-6 rendendolo simile a quello di altri virus A dell'influenza adattati agli esseri umani (Harvey 2004). Gambaryan et al. (2006) hanno gia' identificato due isolati umani che originarono da padre e figlio, entrambi infetti con H5N1, in Hong Kong nel 2003 e che, contrariamente a tutti gli altri isolati umani e aviari di H5N1, mostrarono un'aumentata affinita' per i recettori 2-6 a causa di un'unica mutazione S227N nel sito di legame al recettore per HA1.

Questa occorrenza potrebbe essere dietro l'angolo o potrebbe gia' essere accaduta mentre leggete questo articolo – nessuno lo sa o lo puo' prevedere. Le possibilita' che tale evento possa accadere sono direttamente correlate con la quantita' di virus in circolazione nel pollame e, quindi, al rischio di esposizione per gli esseri umani. Quindi, combattere H5N1 all'origine potrebbe anche ridurre i rischi di pandemia

posti da questo virus. In modo qusi eretico, in uno dei fori di discussione presenti su internet, e' stato proposto che se il dieci per cento della somma di denaro prevista per lo sviluppo di un vaccino umano H5-specifico venisse investito per eradicare l'H5N1 nel pollame, si avrebbe maggior effetto nella protezione della popolazione umana da un'epidemia da H5N1 rispetto alla stessa vaccinazione umana.

Fin dal suo primo isolamento negli esseri umani nel 1997,H5N1 non e' stato in grado di compiere questo ultimo passo verso la pandemia in ospiti umani. Studi recenti, tuttavia, suggeriscono che, durante gli anni, la virulenza di H5N1 nei mammiferi e' aumentata cosi' come la gamma dei possibili ospiti:

- H5N1 isolato da anatre domestiche apparentemente in buona salute in Cina dal 1999 al 2002, e in Vietnam dal 2003 sono diventati progressivamente piu' patogenici nei mammiferi (Chen 2004).
- H5N1 ha ingrandito la gamma degli ospiti e specie di mammiferi (gatti, tigri) che in precedentza erano considerati resistenti all'infezione da virus aviari dell'influenza sono suscettibili a infezione naturale e possono morire a causa dell'infezione (http://www.who.int/csr/don/2004_02_20/en/index.html).

In ogni caso non bisogna ignorare che mentre si osserva cosi' attentamente la situazione in Asia in relazione ad H5N1, altri virus dell'influenza con potenziale pandemico possibilmente maggiore potrebbero emergere o potrebbero gia' essere emersi. Per esempio, ceppi del sottotipo H9N2 che non era presente in Asia prima degli anni 80 non e' solo ampiamente distribuito nella popolazione di pollame asiatico, ma e' passato efficientemente in popolazioni di suini nel sud est e nell'est della Cina (Shortridge 1992, Peiris 2001, Xu 2004). Il recettore per questi virus ha mostrato specificita' simili a quelle dei virus adattati agli umani (Shortridge 1992, Peiris 2001, Xu 2004). Questi virus H9 hanno un'ampia gamma di ospiti, sono geneticamente variabili e possono infettare direttamente gli esseri umani. Il ceppo H9N2, che fu responsabile per l'infezione di esseri umani in Hong Kong, rivelo' perfino un genotipo simile a quello dei virus H5N1 del 1997 (Lin 2000).

Conclusioni

L'importanza dell'influenza aviaria (AI) altamente patogenica come malattia devastante nel pollame e' aumentata decisamente durante lo scorso decennio. L'introduzione di virus AI con sottotipo H5 e H7 con bassa patogenicita' (LP) da un bacino in uccelli acquatici selvatici e' stata alla base di questo processo. Resta da chiarire se e, in questo caso, perche' e' anche cambiata la prevalenza di LP H5 e H7 nei bacini. Per quanto riguarda lo stato endemico dell'HPAI di discendenza asiatica H5N1 in popolazioni di pollame domestico nel sud est asiatico, che causa frequenti riversamenti nelle popolazioni di uccelli migratori, sembra imminente uno spostamento nel paradigma dell'epidemiologia di HPAI verso endemicita' nelle popolazioni di uccelli migratori. Questo comporterebbe gravi conseguenze per l'industria del pollame su scala transcontinentale. I rischi di esposizione per gli esseri umani sono direttamente collegati all'aumentata presenza in pollame domestico di virus potenzialmente zooantroponotici.

Con rispetto alla parte aviaria e veterinaria di questa storia, molte domande sono ancora in attesa di una risposta:

1. La discendenza asiatica HPAIV H5N1 e' gia stabilita endemicamente in popolazioni di uccelli selvatici e migratori?
2. E' possibile che un virus HPAI possa evolvere un fenotipo attenuato in specie di uccelli selvatici e allo stesso tempo mantenere la virulenza nel pollame?
3. I mammiferi terrestri hanno un ruolo nella distribuzione di HPAIV?
4. La parte di sequenza che codifica per il sito di scissione endoproteolitico della proteina HA e' prona a mutazioni solo nei sottotipi H5 e H7?
5. Quale potrebbe essere l'impatto di una vaccinazione di massa nel pollame contro H5N1 in Asia – prevenzione della diffusione virale o un'accelerazione di antigenic drift ed evasione?
6. Cambi nella prevalenza di LPAI sottotipo H5 e H7 nei loro bacini naturali hanno il potenziale di avere effetto sullo stato evoluzionario?

La prima domanda in particolare e' di estrema importanza – non solo per il mondo veterinario. L'endemicita' della discendenza asiatica HPAIV H5N1 negli uccelli migratori creerebbe una minaccia costante agli allevamenti di pollame. Questo potrebbe essere affrontato solamente con strette misure di biosicurezza inclusa la proibizione di allavare pollame libero di circolare. Alternativamente, la vaccinazione di massa del pollame deve essere presa in considerazione. In secondo luogo, l'endemicita' negli uccelli selvatici puo' anche significare la presenza di virus HPAI H5N1 nell'ambiente (laghi, rive ecc) che potrebbe causare un rischio addizionale di esposizione per gli esseri umani. Fin'ora non e' stata riportata trasmissione agli esseri umani da uccelli selvatici o dall'ambiente. Tutte le infezioni umane riportate fin'ora, incluse le piu' recenti in Turchia, sembrano acquisite dopo amplificazione del virus nel, e stretto contatto col, pollame domestico.

La complessita' e l'impatto potenziale della semi-pandemia corrente negli uccelli di HPAI H5N1 zooantroponotico, richiedono un'azione concertata e prudente da parte degli scienziati, degli uomini politici e del pubblico.

Referenze

1. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol 2000; 74: 3-13 Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10799774
2. Allan WH, Alexander DJ, Pomeroy BS, Parsons G. Use of virulence index tests for avian influenza viruses. Avian Dis 1977; 21: 359-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=907578
3. Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, et al. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. Virology 2005; Sep 26; [Epub ahead of print] Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16194557
4. Aymard M, Ferraris O, Gerentes L, Jolly J, Kessler N. Neuraminidase assays. Dev Biol (Basel) 2003; 115: 75-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15088778
5. Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, Capua I, Cordioli P, fioretti A, Alexander DJ. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. Arch Virol. 2001;146: 963-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11448033
6. Bano S, Naeem K, Malik SA. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chicken. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 817-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575070
7. Beard CW, Schnitzlein WM, Tripathy DN. Protection of chicken against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. Avian Dis 1991; 35: 356-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1649592

8. Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. Arch Virol. 1991;119: 37-42. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1863223
9. Beck JR, Swayne DE, Davison S, Casavant S, Gutierrez C. Validation of egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in white leghorn hens. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1196-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575141
10. Becker WB. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa 1961. J Hyg (Lond) 1966; 64: 309-20. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=5223681
11. Belshe RB. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. N Engl J Med. 2005; 353: 2209-11.
12. Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. J Infect Dis 2002; 185: 1005-10. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11930308 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v185n8/011256/011256.html
13. Brown IH, Harris PA, McCauley JW, Alexander DJ. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in european pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. J Gen Virol 1998; 79: 2947-2955. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9880008
14. Brown IH, Hill ML, Harris PA, Alexander DJ, McCauley JW. Genetic characterisation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. Arch Virol 1997; 142: 1045-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9191869
15. Bulaga LL, Garber L, Senne DA, et al. Epidemiologic and surveillance studies on avian influenza in live-bird markets in New York and New Jersey, 2001. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 996-1001. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575100
16. Butt KM, Smith GJ, Chen H, Zhang LJ, Leung YH, Xu KM, Lim W, Webster RG, Yuen KY, Peiris JS, Guan Y. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. J Clin Microbiol. 2005 Nov;43(11):5760-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16272514
17. Capua I, Mutinelli F. Low pathogenicity (LPAI) and highly pathogenic (HPAI) avian influenza in turkeys and chicken. In: Capua I, Mutinelli F. (eds.), A Colour Atlas and Text on Avian Influenza, Papi Editore, Bologna, 2001, pp. 13-20
18. Capua I, Mutinelli F, Marangon S, Alexander DJ. H7N1 avian influenza in Italy (1999-2000) in intensively reared chicken and turkeys. Av Pathol 2000; 29: 537-43
19. Capua I, Marangon S, dalla Pozza M, Terregino C, Cattoli G. Avian influenza in Italy 1997-2001. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 839-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575074
20. Cattoli G, Terregino C, Brasola V, Rodriguez JF, Capua I. Development and preliminary validation of an ad hoc N1-N3 discriminatory test for the control of avian influenza in Italy. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1060-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575111
21. Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fassina S, Terregino C, Robbi C, Vicenzoni G, Capua I. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. Avian Pathol 2004; 33: 432-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15370041
22. Cauthen AN, Swayne DE, Schultz-Cherry S, Perdue ML, Suarez DL. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans. J Virol 2000; 74: 6592-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10864673 - Full text http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/14/6592
23. Centanni E, Savonuzzi O, cited by Stubbs E.L.: "Fowl plague." Diseases of Poultry. 4th ed.; 1965.
24. Centers for Disease Control (CDC). Interim Guidance for Protection of Persons Involved in U.S. Avian Influenza Outbreak Disease Control and Eradication Activities. Accessed on 28th-Dec-2005: http://www.cdc.gov/flu/avian/pdf/protectionguid.pdf

25. Chen J, Lee KH, Steinhauer DA, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. Cell 1998; 95: 409-17. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9814710
26. Chen H, Deng G, Li Z, et al. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 10452-7. Epub 2004 Jul 2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15235128 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/28/10452
27. Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JS, Guan Y. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. Nature 2005; 436: 191-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16007072
28. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? Lancet 2002; 360: 1831-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12480361
29. Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Viet Nam and Thailand in 2004. J Virol 2005; 79: 10821-5 16051873
30. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet 1998; 351: 472-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482438
31. Collins RA, Ko LS, So KL, Ellis T, Lau LT, Yu AC. Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (EurAsian lineage) using NASBA. J Virol Methods 2002; 103: 213-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12008015
32. Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, et al. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. Vaccine 1999; 17: 2265-74. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10403594
33. Davison S, Ziegler AF, Eckroade RJ. Comparison of an antigen-capture enzyme immunoassay with virus isolation for avian influenza from field samples. Avian Dis. 1998; 42: 791-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9876850
34. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90: 4171-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8387212 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/reprint/90/9/4171
35. Du Ry van Beest Holle M, Meijer A, Koopmans M, de Jager C. Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. Euro Surveill 2005; 10 [Epub ahead of print]. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16371696
36. Dybkaer K, Munch M, Handberg KJ, Jorgensen PH. Application and evaluation of RT-PCR-ELISA for the nucleoprotein and RT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of avian influenza virus. J Vet Diagn Invest 2004; 16: 51-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14974847
37. Elbers AR, Kamps B, Koch G. Performance of gross lesions at postmortem for the detection of outbreaks during the avian influenza A virus (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. Avian Pathol 2004; 33: 418-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15370039
38. Elbers AR, Koch G, Bouma A. Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. Avian Pathol 2005; 34: 181-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16191700
39. Feldmann A, Schafer MK, Garten W, Klenk HD. Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos. J Virol 2000; 74: 8018-27. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10933711 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/17/8018
40. Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. Nature. 2003; 422: 428-33. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12660783
41. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of

conserved sequences in the matrix gene. J Clin Microbiol 2000; 38: 4096-101. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11060074

42. Fouchier RA, Olsen B, Bestebroer TM, et al. Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 857-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575077
43. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 1356-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14745020 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/5/1356
44. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005; 79: 2814-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15709000
45. Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 18590-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16339318
46. Gambaryan AS, Tuzikov AB, Pazynina GV, Webster RG, Matrosovich MN, Bovin NV. H5N1 chicken influenza viruses display a high binding affinity for Neu5Acalpha2-3Galbeta1-4(6-HSO3)GlcNAc-containing receptors. Virology. 2004; 326: 310-6.
47. Gambaryan A, Yamnikova S, Lvov D, et al. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. Virology 2005; 334: 276-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15780877
48. Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. Virology 2006; 344: 432-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16226289
49. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdue ML. Heterogeneity in the hemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. J Gen Virol 1996; 77: 1493-504. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8757992
50. Garcia A, Johnson H, Srivastava DK, Jayawardene DA, Wehr DR, Webster RG. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 infection. Avian Dis 1998; 42: 248-56. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9645315
51. Garman E, Laver G. Controlling influenza by inhibiting the virus's neuraminidase. Curr Drug Targets 2004; 5: 119-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15011946
52. Giannecchini S, Campitelli L, Calzoletti L, De Marco MA, Azzi A, Donatelli I. Comparison of in vitro replication features of H7N3 influenza viruses from wild ducks and turkeys: potential implications for interspecies transmission. J Gen Virol 2006; 87: 171-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16361429
53. Gorman OT, Bean WJ, Webster RG. Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis. Curr Top Microbiol Immunol 1992; 176: 75-97. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1600756
54. Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, Yen HL, Guan Y, Peiris M, Nguyen TM, Hanh TH, Puthavathana P, Long HT, Buranathai C, Lim W, Webster RG, Hoffmann E. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. J Virol 2005; 79: 2191-2198. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15681421
55. Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. Proc Natl Acad Sci U S A 2002a; 99: 8950-5.. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12077307 - Full text http://www.pnas.org/cgi/content/full/99/13/8950
56. Guan Y, Peiris JS, Poon LL, et al. Reassortants of H5N1 influenza viruses recently isolated from aquatic poultry in Hong Kong SAR. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 911-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575085

57. Guan Y, Peiris M, Kong KF, et al. H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. Virology 2002b; 292: 16-23. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11878904
58. Guan Y, Poon LL, Cheung CY, Ellis TM, Lim W, Lipatov AS, Chan KH, Sturm-Ramirez KM, Cheung CL, Leung YH, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 8156-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15148370 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/21/8156
59. Guo Y, Wang M, Kawaoka Y, Gorman O, Ito T, Saito T, Webster RG. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. Virology 1992; 188: 245-55. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1314452
60. Haque ME, Koppaka V, Axelsen PH, Lentz BR. Properties and Structures of the Influenza and HIV Fusion Peptides on Lipid Membranes: Implications for a Role in Fusion. Biophys J. 2005; 89:3183-94. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16183890
61. Harvey R, Martin AC, Zambon M, Barclay WS. Restrictions to the adaptation of influenza a virus h5 hemagglutinin to the human host. J Virol. 2004; 78: 502-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14671130 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/1/502
62. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. 2001; Science 293: 1840-1842. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11546875
63. Hayden F, Croisier A. Transmission of avian influenza viruses to and between humans. J Infect Dis 2005;192: 1311-4.
64. Heinen P (2002). Swine influenza: a zoonosis. Vet. Sci. Tomorrow, September 2003. http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html
65. Henzler DJ, Kradel DC, Davison S, et al. Epidemiology, production losses, and control measures associated with an outbreak of avian influenza subtype H7N2 in Pennsylvania (1996-98). Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1022-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575105
66. Herrler G, Hausmann J, Klenk HD. Sialic acid as receptor determinant of ortho- and paramyxoviruses. In: Rosenberg A (ed), Biology of the Sialic Acids, Plenum Press NY, 1995: p. 315-336
67. Hoffmann E, Stech J, Leneva I, et al. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? J Virol 2000; 74: 6309-15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10864640 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/14/6309
68. Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. J Virol 1994; 68: 6074-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8057485 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=8057485
69. Horimoto T, Kawaoka Y. Molecular changes in virulent mutants arising from avirulent avian influenza viruses during replication in 14-day-old embryonated eggs. Virology 1995; 206: 755-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7831837
70. Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, et al. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 10682-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16030144
71. Ito T, Kawaoka Y, Nomura A, Otsuki K. Receptor specificity of influenza A viruses from sea mammals correlates with lung sialyloligosaccharides in these animals. J Vet Med Sci 1999; 61: 955-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10487239
72. Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H (1995). Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. Arch.Virol. 140, 1163-1172. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7646350
73. Ito T, Goto H, Yamamoto E, et al. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chicken. J Virol 2001; 75: 4439-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11287597 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/9/4439

74. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. J Virol 1998; 72: 7367-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9696833 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/72/9/7367

75. Jin M, Wang G, Zhang R, Zhao S, Li H, Tan Y, Chen H. Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. Avian Dis 2004; 48: 870-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15666868

76. Jones YL, Swayne DE. Comparative pathobiology of low and high pathogenicity H7N3 Chilean avian influenza viruses in chicken. Avian Dis 2004; 48: 119-28. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15077805

77. Karasin AI, Brown IH, Carman S, Olsen CW. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. J Virol 2000; 74: 9322-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10982381

78. Katz JM, Lim W, Bridges CB, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. J Infect Dis 1999; 180: 1763-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10558929 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v180n6/990415/990415.html

79. Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chicken associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? Virology 1984; 139: 303-16. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=6516214

80. Kaye D, Pringle CR. Avian influenza viruses and their implication for human health. Clin Infect Dis 2005; 40: 108-12. Epub 2004 Dec 7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15614699

81. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg Infect Dis 2004; 10: 2189-91. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15663858 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no12/04-0759.htm

82. Kessler N, Ferraris O, Palmer K, Marsh W, Steel A. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2173-85. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15131186

83. Kida H, Ito T, Yasuda J, et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. J Gen Virol 1994; 75: 2183-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8077918

84. Kim JA, Ryu SY, Seo SH. Cells in the respiratory and intestinal tracts of chicken have different proportions of both human and avian influenza virus receptors. J Microbiol 2005; 43: 366-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16145552

85. Klenk HD. Infection of the endothelium by influenza viruses. Thromb Haemost 2005 ; 94: 262-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16113814

86. Klempner MS, Shapiro DS. Crossing the species barrier - one small step to man, one giant leap to mankind. N Engl J Med 2004; 350: 1171-2. Epub 2004 Feb 25. http://amedeo.com/lit.php?id=14985471

87. Klopfleisch R, Werner O, Mundt E, Harder T, Teifke JP. Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (*Columbia livia f. domestica*). Vet Pathol 2006; in press

88. Kodihalli S, Haynes JR, Robinson HL, Webster RG. Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. J Virol 1997; 71: 3391-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9094608 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/reprint/71/5/3391

89. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet 2004; 363: 587-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14987882

90. Krauss S, Walker D, Pryor SP, Niles L, Chenghong L, Hinshaw VS, Webster RG. Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. Vector Borne Zoonotic Dis 2004; 4: 177-89. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15631061

91. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, et al. Avian H5N1 influenza in cats. Science 2004; 306: 241. Epub 2004 Sep 2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15345779

92. Kwon YK, Joh SJ, Kim MC, Sung HW, Lee YJ, Choi JG, Lee EK, Kim JH. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in the commercial domestic ducks of South Korea. Avian Pathol 2005; 34: 367-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16147575

93. Landman WJ, Schrier CC. Avian influenza: eradication from commercial poultry is still not in sight. Tijdschr. Diergeneeskd 2004; 129: 782-96. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15624878

94. Le QM, Kiso M, Someya K, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. Nature 2005; 437: 1108. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16228009

95. Lee CW, Suarez DL. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. J Virol Methods. 2004; 119: 151-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15158597

96. Lee CW, Swayne DE, Linares JA, Senne DA, Suarez DL. H5N2 avian influenza outbreak in Texas in 2004: the first highly pathogenic strain in the United States in 20 years? J Virol 2005; 79: 11412-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16103192

97. Lee CW, Senne DA, Suarez DL. Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza. Vaccine 2004; 22: 3175-81. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15297071

98. Lee CW, Suarez DL. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. Anim Health Res Rev. 2005; 6: 1-15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16164006

99. Lees W. The 2004 outbreak of highly pathogenic avian influenza (H7N3) in British Columbia. Cahnet Bull 2004; 9: 4-10. http://www.cahnet.org/bulletinsE/CahnetBulletin9english.pdf

100. Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39: 696-704. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11158130

101. Li KS, Xu KM, Peiris JS, et al. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? J Virol 2003; 77: 6988-94. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12768017 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/77/12/6988

102. Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature 2004; 430: 209-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15241415

103. Li SQ, Orlich M, Rott R. Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chicken, because of hemagglutinin cleavage site changes. J Virol 1990; 64: 3297-303. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2191148 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=2191148

104. Li C, Yu K, Tian G, Yu D, Liu L, Jing B, Ping J, Chen H. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. Virology 2005b; 340: 70-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16026813

105. Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K . Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. 2005a; J Virol 79; 12058-12064. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16140781

106. Lin YP, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, Subbarao K, Guan Y, Krauss S, Shortridge K, Webster R, Cox N, Hay A. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97: 9654-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10920197 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/97/17/9654

107. Lipatov AS, Krauss S, Guan Y, et al. Neurovirulence in mice of H5N1 influenza virus genotypes isolated from Hong Kong poultry in 2001. J Virol 2003; 77: 3816-23. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12610156 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/77/6/3816

108. Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ et al. Influenza: Emergence and control. J Virol 2004; 78: 8951-8959. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15308692 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/17/8951
109. Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, Hulse DJ, Rehg JE, Krauss S, Perez DR, Doherty PC, Webster RG, Sangster MY. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. J Gen Virol 2005; 86: 1121-30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15784906 - Full text at http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/full/86/4/1121
110. Liu M, Wood JM, Ellis T, Krauss S, Seiler P, Johnson C, Hoffmann E, Humberd J, Hulse D, Zhang Y, Webster RG, Perez DR. Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. Virology. 2003; 314: 580-90. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14554086
111. Liu J, Xiao H, Lei F, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. Science 2005; 309: 1206. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16000410
112. Lu X, Tumpey TM, Morken T, Zaki SR, Cox NJ, Katz JM. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. J Virol 1999; 73: 5903-11. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10364342 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/73/7/5903
113. Lu H, Castro AE, Pennick K, Liu J, Yang Q, Dunn P, Weinstock D, Henzler D. Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. Avian Dis. 2003; 47: 1015-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575104
114. Luschow D, Werner O, Mettenleiter TC, Fuchs W. Vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. Vaccine. 2001 Jul 20;19(30):4249-59. http://amedeo.com/lit.php?id=11457552
115. Maines TR, Lu XH, Erb SM, et al. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. J Virol 2005; 79: 11788-800. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16140756
116. Mannelli A, Ferre N, Marangon S. Analysis of the 1999-2000 highly pathogenic avian influenza (H7N1) epidemic in the main poultry-production area in northern Italy. Prev Vet Med. 2005 Oct 19; [Epub ahead of print]. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16243405
117. Marangon S, Capua I, Pozza G, Santucci U. field experiences in the control of avian influenza outbreaks in densely populated poultry areas. Dev Biol (Basel) 2004; 119: 155-64. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15742627
118. Marangon S, Capua I. Control of AI in Italy: from "Stamping-out"-strategy to emergency and prophylactic vaccination. In: Proc. Internat. Conf on Avian Influenza, Paris 2005; O.I.E., p. 29.
119. Matrosovich MN, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chicken, and wild aquatic birds have distinguishable properties. J Virol. 1999; 73: 1146-55. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9882316 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/73/2/1146
120. Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. Virology 2001; 281: 156-62. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11277689
121. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2004b; 101: 4620-4. Epub 2004 Mar 15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15070767 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/13/4620
122. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. J Virol. 2004a; 78: 12665-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15070767 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/13/4620
123. Meulemans G, Carlier MC, Gonze M, Petit P. Comparison of hemagglutination-inhibition, agar gel precipitin, and enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibodies

against influenza viruses in chicken. Avian Dis 1987; 31: 560-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2960313

124. Mo IP, Brugh M, fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE. Comparative pathology of chicken experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. Avian Dis 1997; 41: 125-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9087329
125. Mutinelli F, Capua I, Terregino C, Cattoli G. Clinical, gross, and microscopic findings in different avian species naturally infected during the H7N1 low- and high-pathogenicity avian influenza epidemics in Italy during 1999 and 2000. Avian Dis 2003a; 47: Suppl: 844-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575075
126. Mutinelli F, Hablovarid H, Capua I. Avian embryo susceptibility to Italian H7N1 avian influenza viruses belonging to different lineages. Avian Dis 2003b; 47: Suppl: 1145-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575131
127. Nakatani H, Nakamura K, Yamamoto Y, Yamada M, Yamamoto Y. Epidemiology, pathology, and immunohistochemistry of layer hens naturally affected with H5N1 highly pathogenic avian influenza in Japan. Avian Dis 2005; 49: 436-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16252503
128. Neumann G, Hatta M, Kawaoka Y. Reverse genetics for the control of avian influenza. Avian Dis. 2003;47(3 Suppl):882-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575081
129. Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. Curr Top Microbiol Immunol 2004; 283: 121-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15298169
130. Nestorowicz A, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission? Virology 1987; 160: 411-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3660587
131. Ng EK, Cheng PK, Ng AY, Hoang TL, Lim WW. Influenza A H5N1 detection. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1303-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16102326 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no08/04-1317.htm
132. Normile D. Avian influenza. China will attempt largest-ever animal vaccination campaign. Science. 2005; 310: 1256-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16311302
133. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.14. Avian influenza. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm - Accessed 28 December 2005
134. OIE. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 2.7.12. Avian influenza. http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_2.7.12.htm - Accessed 28 December 2005
135. OIE 2005 (World Organisation for Animal Health). Highly pathogenic avian influenza in Mongolia: in migratory birds. http://www.oie.int/eng/info/hebdo/ais_55.htm - Accessed 31 octobre 2005.
136. Okazaki K, Takada A, Ito T, et al. Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. Arch Virol 2000; 145: 885-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10881676
137. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. Virus Res 2002; 85:199-210. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12034486
138. Pasick J, Handel K, Robinson J, et al. Intersegmental recombination between the hemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. J Gen Virol 2005; 86: 727-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15722533
139. Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Keawcharoen J, Oraveerakul K, Amonsin A, Poovorawan Y. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. Viral Immunol 2004; 17: 588-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15671756
140. Pearson JE. International standards for the control of avian influenza. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 972-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575096

141. Peiris JS, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster RG, Shortridge KF. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary 'human' H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? J Virol 2001; 75: 9679-86. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11559800 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/20/9679

142. Perez DR, Lim W, Seiler JP, et al. Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chicken. J Virol 2003; 77: 3148-56. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12584339 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/77/5/3148

143. Perdue ML, Garcia M, Senne D, Fraire M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. Virus Res 1997; 49: 173-86. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9213392

144. Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. Vet Microbiol 2000; 74: 77-86. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10799780

145. Perdue ML. Molecular diagnostics in an insecure world. Avian Dis 2003; 47: 1063-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575112

146. Perkins LE, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. Avian Dis 2002a; 46: 53-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11924603

147. Perkins LE, Swayne DE. Susceptibility of laughing gulls (*Larus atricilla*) to H5N1 and H5N3 highly pathogenic avian influenza viruses. Avian Dis 2002b; 46: 877-85. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12495048

148. Perkins LE, Swayne DE. Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. Avian Dis. 2003;47(3 Suppl):956-67. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575094

149. Perroncito CE. [it. Typhoid epizootic in gallinaceous birds.] Epizoozia tifoide nei gallinacei. Torino: Annali Accademia Agricoltura 1878; 21:87-126.

150. Phipps LP, Essen SC, Brown IH. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. J Virol Methods 2004;122:119-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15488629

151. ProMED 20050826.2527. Avian influenza H5N1, Civets 2005. Archive number 20050826.2527. Available at http://www.promedmail.org/pls/promed

152. ProMED 20060110.0090. Japan: Mild Avian Influenza Virus Infection Too Risky to Ignore. Archive number 20060110.0090. Available at http://www.promedmail.org/pls/promed

153. Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, et al. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. J Infect Dis 2005; 192: 1318-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16170747 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v192n8/34097/34097.html

154. Quirk M. Zoo tigers succumb to avian influenza. Lancet Infect Dis 2004; 4:716. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15593440

155. Rimmelzwaan GF, Kuiken T, van Amerongen G, Bestebroer TM, Fouchier RA, Osterhaus ADME. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. J Virol 2001; 77: 3148-3156. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11413336 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/14/6687

156. Rogers SO, Starmer WT, Castello JD. Recycling of pathogenic microbes through survival in ice. Med Hypotheses 2004; 63: 773-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15488645

157. Rohm C, Horimoto T, Kawaoka Y, Suss J, Webster RG. Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? Virology 1995; 209: 664-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7778300

158. Rott R, Orlich M, Scholtissek C. Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. III. Non-pathogenic recombinants derived from highly pathogenic

parent strains. J Gen Virol 1979; 44: 471-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=521799

159. Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M. Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. Am J Respir Crit Care Med. 1995; 152: S16-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7551406
160. Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. Nat Struct Mol Biol 2004; 11: 567-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15122347
161. Saito T, Lim W, Suzuki T, et al. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. Vaccine 2001; 20: 125-33. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11567756
162. Sala G, Cordioli P, Moreno-Martin A, et al. ELISA test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1057-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575110
163. Schäfer W. Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest. Zeitschr Naturforschung 1955; 10b: 81-91
164. Scholtissek C, Hinshaw VS, Olsen CW. Influenza in pigs and their role as the intermediate host. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds.), Textbook of Influenza, Blackwell Scientific, Oxford, 1998; p 137-145
165. Selleck PW, Lowther SL, Russell GM, Hooper PT. Rapid diagnosis of highly pathogenic avian influenza using pancreatic impression smears. Avian Dis 2003; 47 (3 Suppl): 1190-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575140
166. Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, et al. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. Avian Dis 1996; 40: 425-37. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8790895
167. Seo SH, Goloubeva O, Webby R, Webster RG. Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. J Virol 2001; 75: 9517-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11533214 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/19/9517
168. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. 2002; Nat Med 8: 950-954. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12195436
169. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. Virus Res 2004; 103: 107-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15163498
170. Shafer AL, Katz JB, Eernisse KA. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. Avian Dis. 1998; 42: 28-34. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9533078
171. Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency but not cell tropism of Hong Kong H5N1 influenza viruses in mice. Virology 2004; 320: 258-266. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15016548
172. Shortridge KF. Pandemic influenza: a zoonosis? Semin Respir Infect 1992; 7: 11-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1609163
173. Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, et al. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology. 1998 Dec 20;252(2):331-42. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9878612
174. Sidorenko Y, Reichl U. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. Biotechnol Bioeng 2004; 88: 1-14. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15384040
175. Skehel JJ, Cross K, Steinhauer D, Wiley DC. Influenza fusion peptides. Biochem Soc Trans. 2001; 29: 623-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11498040
176. Smith AW, Skilling DE, Castello JD, Rogers SO. Ice as a reservoir for pathogenic human viruses: specifically, caliciviruses, influenza viruses, and enteroviruses. Med Hypotheses 2004; 63: 560-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15324997

177. Snyder DB, Marquardt WW, Yancey FS, Savage PK. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against avian influenza virus. Avian Dis 1985; 29: 136-44. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3985870

178. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J Clin Microbiol 2002; 40: 3256-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12202562

179. Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. Persistence of avian influenza viruses in water. Avian Dis 1990a; 34: 406-11. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2142420

180. Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM, Zwank PJ. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. Avian Dis 1990b; 34: 412-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2142421

181. Stech J, Garn H, Wegmann M, Wagner R, Klenk HD. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. 2005; Nat Med 11: 683-689. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15924146

182. Stegeman A, Bouma A, Elbers AR, et al. Avian influenza A virus (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003: course of the epidemic and effectiveness of control measures. J Infect Dis 2004; 190: 2088-95. Epub 2004 Nov 15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15551206 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v190n12/32647/32647.html< /A>

183. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology 1999; 258: 1-20. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10329563

184. Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, et al. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. J Virol 2004; 78: 4892-901. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15078970 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/9/4892

185. Suarez DL, Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. Dev Comp Immunol. 2000; 24: 269-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10717293

186. Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee CW, Manvell RJ, Mathieu-Benson C, Moreno V, Pedersen JC, Panigrahy B, Rojas H, Spackman E, Alexander DJ. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. Emerg Infect Dis 2004; 10: 693-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15200862 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no4/03-0396.htm

187. Suarez DL. Overview of avian influenza DIVA test strategies. Biologicals. 2005; 33: 221-6 Epub 2005 Oct 28. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16257543

188. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE Jr, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. J Virol 2000; 74:11825-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11090182 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/24/11825

189. Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol Pharm Bull 2005; 28: 399-408. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15744059

190. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. Rev Sci Tech 2000a; 19: 463-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10935274

191. Swayne DE, Beck JR, Kinney N. Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chicken preimmunized with a fowl pox vaccine. Avian Dis 2000b; 44: 132-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10737653

192. Swayne DE, Beck JR, Mickle TR. Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chicken against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. Avian Dis 1997; 41: 910-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9454926

193. Swayne DE, Beck JR, Perdue ML, Beard CW. Efficacy of vaccines in chicken against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza. Avian Dis 2001; 45: 355-65. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11417815

194. Swayne DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, Suarez DL. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chicken immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. Vaccine 2000c; 18: 1088-95. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10590330

195. Swayne DE, Suarez DL, Schultz-Cherry S, et al. Recombinant paramyxovirus type 1-avian influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chicken against influenza and Newcastle disease. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1047-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575108

196. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature. 2005 Oct 6;437(7060):889-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16208372

197. Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. Emerg Infect Dis 2005; 11: 699-701. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15890122 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no05/05-0007.htm

198. Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li C, Shi J, Yu K, Chen H. Protective efficacy in chicken, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. Virology 2005; 341: 153-62. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16084554

199. Tumpey TM, Alvarez R, Swayne DE, Suarez DL. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. J Clin Microbiol 2005; 43: 676-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15695663

200. van der Goot JA, Koch G, de Jong MC, van Boven M. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102: 18141-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16330777 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/102/50/18141

201. Veits J, Luschow D, Kindermann K, et al. Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chicken, and UL0 mutants expressing influenza virus hemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague. J Gen Virol 2003; 84: 3343-52. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14645915

202. Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. Rev Med Virol 2002; 12: 159-66. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11987141

203. Wagner R, Herwig A, Azzouz N, Klenk HD. Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. J Virol 2005; 79: 6449-58. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15858028 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/79/10/6449

204. Walker JA, Kawaoka Y. Importance of conserved amino acids at the cleavage site of the haemagglutinin of a virulent avian influenza A virus. J Gen Virol 1993; 74: 311-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8429306

205. Wan H, Perez DR. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. Virology. 2005 Dec 1; [Epub ahead of print]. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16325879

206. Watowich SJ, Skehel JJ, Wiley DC. Crystal structures of influenza virus hemagglutinin in complex with high-affinity receptor analogs. Structure 1994; 2: 719-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7994572

207. Webster RG, Yakhno MA, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. Virology 1978; 84: 268-78. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=23604

208. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 1992; 56: 152-79. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1579108

209. Webster RG. Influenza: An emerging disease. Emerg Infect Dis 1998; 4: 436-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9716966 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no3/webster.htm

210. Webster RG, Hulse DJ. Microbial adaptation and change: avian influenza. Rev Sci Tech. 2004; 23: 453-65. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15702713

211. Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. Emerg Infect Dis 2006; 12: 3-8 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1024.htm

212. Whittaker G, Bui M, Helenius A. The role of nuclear import and export in influenza virus infection. Trends Cell Biol. 1996 Feb;6(2):67-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15157497

213. WHO 2004/01/22. Avian influenza H5N1 infection in humans: urgent need to eliminate the animal reservoir. http://www.who.int/csr/don/2004_01_22/en/index.html - Accessed 31 October 2005.

214. WHO 2004/03/02. Avian influenza A(H5N1)- update 31: Situation (poultry) in Asia: need for a long-term response, comparison with previous outbreaks. http://www.who.int/csr/don/2004_03_02/en/index.html - Accessed 31 Octobre 2005.

215. WHO 2004/08/20. Avian influenza: H5N1 detected in pigs in China. http://www.who.int/csr/don/2004_08_20/en/index.html - Accessed 30 October 2005.

216. WHO 2004/10/29. Laboratory study of H5N1 viruses in domestic ducks: main findings. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/labstudy_2004_10_29/en - Accessed 30 October 2005.

217. WHO 2005/08/18. Geographical spread of H5N1 avian influenza in birds - update 28. http://www.who.int/csr/don/2005_08_18/en/index.html - Accessed 31 October 2005.

218. WHO 2005. Avian Influenza: Assessing the pandemic threat. http://www.who.int/csr/disease/influenza/H5N1-9reduit.pdf

219. WHO 2006. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en

220. WHO Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. Emerg Infect Dis. 2005; 11: 1515-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16318689 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no10/05-0644.htm

221. Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, Xie T, Webster RG. Matrix gene of influenza a viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza a viruses. J Virol 2004; 78: 8771-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15280485 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/16/8771

222. Witt CJ, Malone JL. A veterinarian's experience of the spring 2004 avian influenza outbreak in Laos. Lancet Infect Dis 2005; 5: 143-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15766647

223. Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. Arch Virol 1993; 130: 209-17. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8503786

224. Woolcock PR, McFarland MD, Lai S, Chin RP. Enhanced recovery of avian influenza virus isolates by a combination of chicken embryo inoculation methods. Avian Dis 2001; 45: 1030-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11785874

225. Xu X, Subbarao, Cox NJ, Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. Virology 1999; 261: 15-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10484749

226. Xu C, Fan W, Wei R, Zhao H (2004). Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003 (H9N2) virus. Microbes Infect 6: 919-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15310468

227. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482437

228. Zhou N, He S, Zhang T, Zou W, Shu L, Sharp GB, Webster RG. Influenza infection in humans and pigs in southeastern China. Arch Virol. 1996;141(3-4):649-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8645101

229. Zhou EM, Chan M, Heckert RA, Riva J, Cantin MF. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. Avian Dis 1998; 42: 517-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9777152

230. Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. J Virol. 2002; 76: 4420-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11932409 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/76/9/4420

Chapter 3: Virologia dell'influenza umana

Lutz Gürtler

I virus influenzali umani appartengono alla famiglia orthomyxoviridae che consiste di tre generi: virus influenzali A, B e C e (nelle zecche) Thogovirus. Negli esseri umani solo i virus A e B dell'influenza sono di interesse epidemiologico.

I principali determinanti antigenici dei virus A e B dell'influenza sono le proteine transmembrana emagglutinina (H o HA) e neuraminidasi (N o NA). Sulla base dell'antigenicita' di queste glicoproteine, i virus A dell'influenza sono suddivisi ulteriormente in 16 sottotipi H (H1-H16) e 9 sottotipi N (N1-N9). La nomenclatura completa degli isolati di virus dell'influenza richiede la connotazione del tipo di virus influenzale (A o B), la specie dell'ospite (omessa se di origine umana), il sito geografico, il numero di serie, l'anno di isolamento e, infine, le varianti H ed N in parentesi per esempio: A/oca/Guangdong/1/96 (H5N1).

I virus influenzali sono trasmessi normalmente tramite piccole gocce nell'aria, e sono in grado di contaminare la mucosa del tratto respiratorio. Sono capaci di penetrare lo strato di muco sulla superfice esterna del tratto respiratorio e di penetrare le cellule epiteliali, cosi' come altri tipi cellulari. La replicazione e' molto rapida: solo dopo 6 ore dall'infezione i primi virus influenzali vengono rilasciati dalle cellule infette. Parte dell proteine virali, come il peptide per la fusione e NS2, agiscono come tossine per la promozione di virus influenzale. E' possibile che nelle fasi iniziali di replicazione virale si verifichi una rapida crescita batterica, comunemente di *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, e *Haemophilus influenzae* (per maggiori dettagli vedere il capitolo sulla Patogenesi).

Struttura

I virus influenzali sono virus ricoperti da membrane con genoma ad RNA a singola elica con sembianze pleomorfiche e un diametro medio di 120 nm. La superfice della particella e' ricoperta da proiezioni dell'emagglutinina e della neuraminidasi (Figura 1).

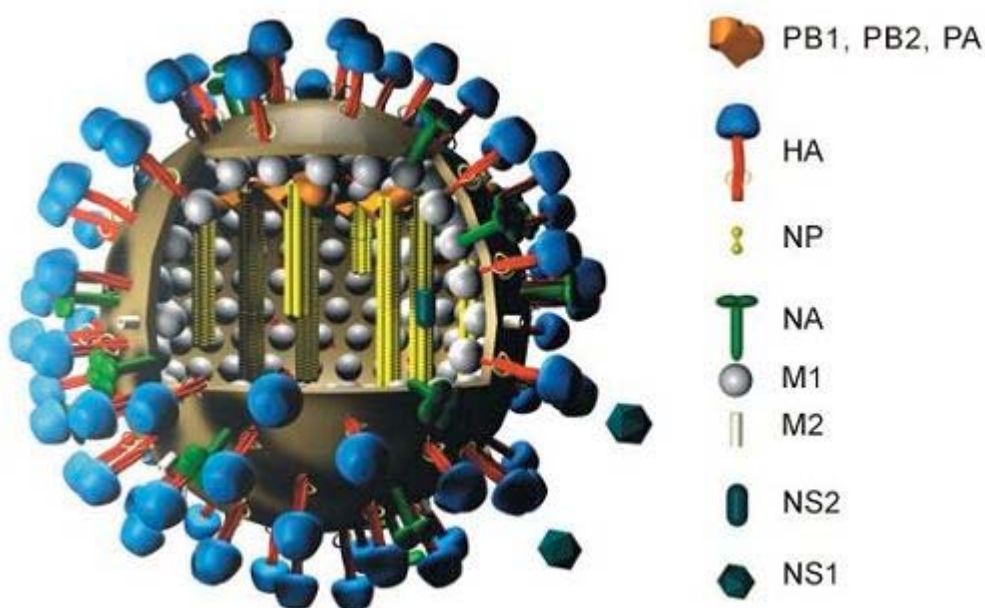



Figura 1. Struttura di un virus A dell'influenza. Copyright Dr. Markus Eickmann, Institute for Virology, Marburg, Germany. Usata con permesso. - http://www.biografix.de

I genomi dei virus A e B dell'influenza consistono di 8 segmenti separati coperti dalla proteina del nucleocapside. Insieme, questi costituiscono la ribonucleoproteina (RNP), e ogni segmento codifica per una proteina funzionalmente importante:

1. Proteina polimerasi B2 (PB2)
2. Proteina polimerasi B1 (PB1)
3. Proteina polimerasi A (PA)
4. Emagglutinina (HA or H)
5. Proteine del nucleocapside (NP)
6. Neuraminidasi (NA or N)
7. Proteine della matrice (M): M1 costruisce la matrice; e solamente nei virus A dell'influenza, M2 agisce come una canale ionico che pompa ioni per abbassare o mantenere il pH dell'endosoma
8. Proteine non strutturali (NS); la funzione di NS2 e' ipotetica

La polimerasi RNA-RNA attiva , che e' responsabile per la replicazione e la trascrizione, e' formata da PB2, PB1 e PA. Ha attivita' endonucleasica ed e' collegata alle RNP. Le proteine NS1 e NS2 hanno una funzione regolatoria che promuove la sintesi di componenti virali nelle cellule infette (vedi di seguito).

La membrana che avvolge il virus e' una membrana con doppio strato lipidico che origina dalla cellula produttrice di virus e che contiene prominenti proiezioni

formate da HA e NA, cosi' come dalla proteina M2. Lo strato lipidico copre la matrice che e' formata dalla proteina M1.

Il virus C dell'influenza contiene solo 7 segmenti genomici e solo una glicoproteina superficiale. Dal momento che negli esseri umani presenta bassa patologia non verra' discusso in dettaglio.

Emagglutinina

L'emagglutinina (HA o H) e' una glicoproteina che contiene 2 o 3 siti di glicosilazione, con peso molecolare di circa 76,000. Attraversa la membrana lipidica in modo che la maggior parte, che contiene almeno 5 domini antigenici, viene presentata sulla superfice esterna. HA e' usata come recettore quando si lega all'acido sialico (acido N-acetyl neuraminico) e induce la penetrazione dell'interno della particella virale tramite fusione delle membrane. L'emagglutinina e' il principale antigene del virus influenzale; i siti antigenici sono A, B (che portano il sito di legame al recettore), C, D e E. I siti antigenici sono presenti in testa alla molecola, mentre i piedi sono immersi nello strato lipidico. La parte centrale della proteina contiene la regione del gambo e il dominio fusogenico che e' necessario per la fusione delle membrane quando il virus infetta una nuova cellula. A pH basso il peptide di fusione viene girato in posizione interna. HA forma trimeri e numerosi trimeri formano un poro di fusione.

Mutazioni prominenti nei siti antigenici riducono od inibiscono il legame di anticorpi neutralizzanti e di conseguenza permettono a nuovi sottotipi di divulgarsi in una popolazione non immune. Questo fenomeno e' chiamato **deriva antigenica (antigenic drift)**. Le mutazioni che causano la deriva antigenica sono la spiegazione molecolare delle epidemie influenzali stagionali in inverno nelle regioni climatiche temperate. La risposta immunitaria ai siti antigenici HA e' seguita dalla produzione di anticorpi neutralizzanti, che sono alla base della risoluzione dell'infezione in un individuo, e che a volte sono parte dell'immunita' incrociata presente nelle persone anziane in presenza di un virus pandemico.

Lo **spostamento antigenico (antigenic shift)** – anche chiamato riassortimento genomico o semplicemente riassortimento – sorge quando HA viene sostituita in un virus, per esempio H1 sostituita da H5 generando un virus a mosaico. Questo puo' aver luogo quando una cellula e' infettata con due diversi virus influenzali e i loro segmenti genomici vengono scambiati durante la replicazione.

Il fenomeno del riassortimento genomico avviene di frequente negli uccelli acquatici, specialmente nelle anatre. Sebbene gli uccelli siano raramente sintomatici dopo l'infezione, il virus viene rilasciato nelle feci per diversi mesi.

Neuraminidasi

Come la HA, la neuraminidasi (NA o N) e' una glicoproteina, e anch'essa e' presente come proiezioni sulla superfice del virus. La neuraminidasi forma una struttura tetramerica con un peso molecolare medio di 220,000. La molecola NA presenta la maggior parte della sua struttura sulla superfice esterna della cellula, attraversa lo strato lipidico, e possiede una piccola coda citoplasmatica.

NA agisce come un enzima e scinde l'acido sialico dalla molecola HA, da altre molecole NA e da glicoproteine e glicolipidi sulla superfice cellulare. Ha anche la funzione di servire come importante sito antigenico e, in aggiunta, sembra essere

necessaria per la penetrazione del virus nello strato di mucina dell'epitelio respiratorio.

La deriva antigenica puo' avvenire anche nell'NA. L'NA contiente parecchi residui amminoacidici importanti che, se mutati, possono portare a resistenza contro gli inibitori della neuraminidasi. Sono state osservate le seguenti mutazioni:

- R292K
- H274Y, R152K, E119V

Le lettere rappresentano gli amminoacidi (R, arginina; K, lisina; H, istidina; Y, tirosina; E acido glutammico; V, valina): la prima lettera rappresenta l'amminoacido originale, e l'ultima lettera l'amminoacido presente dopo mutazione.

Quando l'amminoacido arginina (R) e' rimpiazzato con lisina (K) in posizione 292 della glicoproteina neuraminidasi, e' possibile che si verifichi resistenza completa. La mutazione da R a K e' legata a un singolo cambio nucleotidico nel gene N da AGA a AAA. La posizione 292 e' significativa perche' la mutazione induce resistenza non solo contro il farmaco oseltamivir, ma anche contro zanamivir ed altri due profarmaci.

Proteina M2

Quando la particella virale entra l'endosoma, l'attivita' del canale ionico M2 aumenta in modo da consentire l'ingresso di ioni nella particella, inducendo cosi' un pH basso. A causa di questo il legame HA-M1 viene disturbato, la particella si apre, il peptide di fusione con HA viene translocato, e HA si fonde con lo strato interno della membrana endosomale. Le ribonucleoproteine vengono rilasciate nel citoplasma della cellula e trasportate al nucleo, dove il complesso viene dissolto, e incomincia la sintesi di RNA virale.

L'attivita' della proteina M2 e' inibita da amantidina, rimantidina e altre sostanze a loro imparentate.

Possibile funzione di NS1

L'RNA messaggero umano contiene una coda di nucleotidi A all'estremita' 5', con peso molecolare 26,000 e forma un dimero che inibisce l'esportazione di molecole mRNA che la contengono dal nucleo, dando cosi' preferenza all'RNA virale che viene trasportato ai ribosomi e tradotto. NS1 potrebbe inibire lo splicing del pre-mRNA. In aggiunta, NS1 e' probabilmente capace di sopprimere la risposta dell'interferone nelle cellule infette con il virus con la conseguente produzione di virus senza ostacoli.

Possibile funzione di NS2

L'NS2 e' una molecola piccola con peso molecolare 11,000. Potrebbe essere legata alla proteina M1 nella particella virale. Si crede che la sua funzione sia di facilitare il trasporto di RNP di nuova sintesi dal nucleo al citoplasma per accellerare la produzione di virus.

Ciclo di replicazione

Assorbimento del virus

Il virus dell'influenza si lega alla superfice cellulare tramite il legame dell'estremita' esterna dell'HA all'acido sialico delle glicoproteine o dei glicolipidi cellulari. Il legame dell'acido sialico al penultimo galattosio, alfa 2,3 (negli uccelli) o alfa 2,6 (negli esseri umani) determina la specificita' dell'ospite. Dal momento che numerose cellule dell'organismo contengono carboidrati che presentano acido sialico, l'abilita' di legame dell'HA spiega il perche' della possibilita' che diversi tipi cellulari di un organismo possano essere infettati.

Ingresso del virus

Dopo l'attaccamento, il virus viene internalizzato dalla cellula tramite un processo di endocitosi mediato da recettori in vescicole ricoperte di clatrina. Una volta internalizzate, le molecole di clatrina sono rilasciate e la vescicola contenente l'intero virus si fonde con gli endosomi. Il contenuto della vescicola viene normalmente digerito tramite un abbassamento graduale del pH all'interno del fagosoma.

Perdita della membrana virale

Quando si raggiunge un certo livello, l'abbassamento del pH viene fermato dall'azione della proteina M2 che induce la liberazione parziale del peptide di fusione dell'HA. Questo permette la fusione di HA con la membrana della vescicola e il rilascio delle ribonucleoproteine (RNP) nel citoplasma, come descritto in precedenza. L'influsso di ioni dall'endosoma alla particella virale porta al distacco delle varie proteine virali; l'aggregazione della proteina M1 viene distrutta e le RNP non aderiscono piu' al complesso formato dalla proteina M1. La membrana virale e' completamente rimossa entro 20-30 min dall'attacamento del virus.

Sintesi di RNA virale e di proteine virali

Le RNP vengono trasportate al nucleo dove il complesso della polimerasi si lega all'RNA virale, lo libera dalle RNP tramite la sua attivita' di endonucleasi e simultaneamente ne favorisce l'elongazione. La produzione di RNA virale e' limitata da NP in favore di mRNA. Entrambi sono trasportati al citoplasma, dove le proteine virali sono tradotte nei ribosomi. Parte dell'mRNA virale viene sottoposto a splicing da enzimi cellulari in modo da poter sintetizzare proteine virali come M1 e NS2 senza la necessita' di ulteriori scissioni. Alcune proteine virali di nuova sintesi vengono trasportate al nucleo dove si legano a RNA virale e formano RNP. Altre proteine virali di nuova sintesi vengono processate nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi dove vengono glicosilate. Queste proteine cosi' modificate vengono trasportate alla membrana cellulare e si inseriscono nel doppio strato lipidico. Quando le proteine virali raggiungono una concentrazione sufficente nella membrana, le RNP e le proteine M1 si aggregano e si condensano per produrre la particella virale. Infine, la particella virale si estrude dalla membrana e viene rilasciata tramite l'attivita' della neuraminidasi.

Il periodo di tempo che passa dall'ingresso del virus nella cellula alla produzione di nuovi virus e' di circa 6 ore.

Rilascio del virus e contagiosita'

Immagini immunoistologiche mostrano che esistono foci di cellule produttrici di virus raggruppati nello strato mucoso del tratto respiratorio, nell'intestino e persino negli strati endoteliali, nel miocardio e nel cervello. All'interno delle secrezioni nasali vengono rilasciati milioni di particelle virali per ml, tanto che una particella di areosol con dimensioni di 0.1 µl contiene piu' di 100 particelle virali. Un singola HID (human infectious dose – dose infettiva negli umani) di virus influenzale puo' essere composta da 100 a 1,000 particelle. Il virus puo' essere rivelato, se non altro all'inizio dell'infezione, anche nel sangue ed in altri fluidi del corpo. La contagiosicita' delle particelle influenzali viene conservata in maniera dipendente dalla temperatura, dal pH e dalla salinita' dell'acqua, e da radiazioni UV. A causa della conformazione del doppio strato lipidico, la sopravvivenza in condizioni ambientali normali, dovrebbe essere breve.

La contagiosicita' delle particelle di virus influenzale e' facilmente inattivata da tutti i disinfettanti alcolici, da cloro e dalle aldeidi. Da quanto e' noto, le temperature al di sopra di 70 ºC distruggono l'infettivita' del virs in pochi secondi.

Referenze

1. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ. Textbook of Influenza. Blackwell Science, Oxford, 1998.
2. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: The viruses and their Replication. In: Fields Virology fourth edition, Knipe DM, Howley PM eds, Lippincott, Philadelphia 2001, pp 1487-1531
3. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields Virology fourth edition, Knipe DM, Howley PM eds, Lippincott, Philadelphia 2001, pp 1533-1579

Special reference

Wetherall NT, Trivedi T, Zeller J, Hodges-Savola C, McKimm-Breschkin JL, Zambon M, Hayden FG. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. J Clin Microbiol 2003; 41: 742-750. Full text at http://jcm.asm.org/cgi/content/full/41/2/742?view=long&pmid=12574276

Chapter 4: Patogenesi e Immunologia

Georg Behrens and Matthias Stoll

Il virus dell'influenza e' ben noto per la sua peculiare abilita' nel causare epidemie ricorrenti e pandemie globali, durante le quali malattia acuta febbrile del sistema respiratorio accade in maniera esplosiva in tutte le fasce d'eta'. Due qualita' dell'influenza sono principalmente responsabili per lo spargimento del virus a livello epidemiologico. Prima, e' l'abilita' di emergere e circolare in bacini di riserva aviari o porcini, sia a causa di riassortimento genetico che per trasmissione diretta, con la conseguente disseminazione agli esseri umani ad intervalli regolari. Secondo, e' il cambiamento antigenico, veloce ed imprevedibile, in importanti bersagli immunitari una volta che il virus diventa stabile negli esseri umani.

Un virus altamente contagioso che causa mortalita' estensiva e un alto tasso di fatalita' nei casi, causa ansieta' archetipica. Il virus dell'influenza, come agente patologico negli esseri umani, e' in circolazione nella popolazione umana da almeno il sedicesimo secolo (Cox & Kawaoka 1998) ed ha portato a epidemie ricorrenti di malattia febbrile respiratoria con una frequenza da uno a tre anni. In aggiunta, ogni secolo e' stato testimone di una qualche pandemia dovuta all'emergenza di un virus nuovo contro cui la maggior parte della popolazione non possiede alcuna immunita' e che ha progredito con il coinvolgimento di tutte le aree del mondo. Le caratteristiche delle pandemie includono occorrenza al di fuori della stagione usuale, una trasmissione estremamente rapida con epidemie simultanee a livello globale, e un'alta incidenza di attacchi in tutte le fasce d'eta' con alto tasso di mortalita' anche in adulti giovani e sani. Data la crescente popolazione globale, insieme ai viaggi e al turismo internazionale, pandemie influenzali incombenti hanno una maggiore potenzialita' di essere disseminate con anche maggiore rapidita'. Questo capitolo mira a descrivere sia la patogenesi della malattia che la lotta fra il virus e il sistema immunitario, con lo scopo di capire, in maniera comprensiva, cosa c'e' dietro a questa minaccia di epidemia globale.

Patogenesi

La patogenicita' e la virulenza del virus dell'influenza sono determinate da numerosi fattori che interagiscono fra di loro:

a. Fattori dell'ospite:

   - Presenza di recettori bersaglio nelle cellule dell'ospite
   - Disponibililta' di enzimi nelle cellule dell'ospite essenziali per l'ingresso e la replicazione virale
   - Stato di immunocompetenza degli ospiti individuali
   - Immunita' specifica contro certi epitopi virali in ospiti individuali e nella popolazione sotto attacco

- o Abilita' del sistema immunitario di controllare la replicazione virale senza il danneggiamento collaterale dovuto alla risposta infiammatoria

b. Fattori virali:

- o Abilita' di legame alle cellule dell'ospite
- o Abilita' del virus alla diffusione
- o Limitazione degli effetti citopatogenici che permette un bilancio fra la replicazione virale e il controllo da parte dell'ospite
- o Evasione dei sistemi di immunosorveglianza tramite evoluzione di variazione genetica guidata da pressione selettiva della risposta immunitaria
- o Evasione dei sistemi di immunosorveglianza tramite ricombinazione con vari ceppi virali da malattia zoonotica
- o Modulazione della risposta immunitaria per attenuare l'efficienza dei meccanismi di difesa dell'ospite.

Ingresso del virus: come fa il virus a penetrare l'ospite?

Il modo predominante per cui il virus dell'influenza viene trasmesso e' da persona a persona via areosol e spruzzi di piccole goccie. Il virus dell'influenza entra cosi' il tratto respiratorio. In un polmone umano ci sono circa 300 milioni di sacchi terminali, detti alveoli, che hanno la funzione di scambiare gas tra l'aria ispirata e il sangue. L'area totale di assorbimento dei polmoni umani varia fra gli 80 e i 120 m^2. La velocita' di ventilazione a riposo negli esseri umani e' di circa 6 litri d'aria al minuto, il che introduce nei polmoni numerose particelle di origine ignota e piccole goccie di areosol che possono contenere il virus. La deposizione di particelle dipende dalla loro dimensione: l'inalazione di particelle molto piccole non risulta nell'assorbimento attraverso gli alveoli o il sistema bronchiale. Particelle con un diametro di approssimativamente da 1 a 4 µm precipitano nelle piccole vie respiratorie. Particelle molto piu' grandi o non sono in grado di entrare l'apparato respiratorio o vengono depositate nelle alte vie respiratorie (Figura 1A).

Numerosi meccanismi di difesa dell'ospite, incluse le barriere meccaniche, bloccano le infezioni dell'apparato respiratorio. Le vie respiratorie sono coperte da uno strato mucociliare che consiste di cellule ciliate, di cellule che secernono muco e di ghiandole (Figura 1B). Le particelle estranee che entrano le cavita' nasali o il tratto respiratorio superiore vengono intrappolate nel muco, riportate alla gola e ingoiate. Le particelle estranee vengono fatte risalire dal tratto respiratorio inferiore dall'attivita' ciliare delle cellule epiteliali. Negli alveoli, in cui mancano sia cilia che muco, sono i macrofagi che sono responsabili per la distruzione dlle particelle (Figura 1).

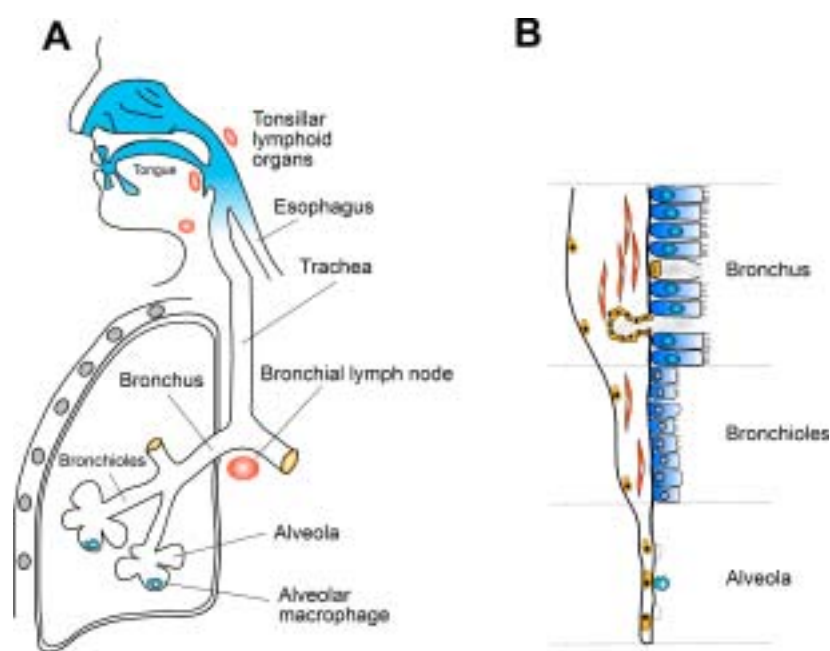



Figura 1. Siti di ingresso dell'influenza nell'apparato respiratorio. (A) Strutture anatomiche e funzionali delle vie respiratorie umane. L'influenza infeatta in primo luogo le vie respiratorie superiori e le cellule ciliate di bronchi e bronchioli. Le sindromi cliniche che risultano dall'infezione sono tracheite, bronchite, bronchiolite, e broncopneumonia. La risposta immunitaria adattativa inizia in linfonodi lungo le vie respiratorie. (B) L'epitelilo dell'apparato respiratorio e' equipaggiato in maniera speciale per la difesa da i patogeni che entrano il sistema con uno strato di muco (bronchi), cellule ciliate (bronchi e bronchioli) e macrofagi alveolari (alveolli).

Legame alle cellule dell'ospite

I bersagli principali del virus dell'influenza sono le cellule epiteliali colonnari del tratto respiratorio. Queste cellule possono essere suscettibili all'infezione se il recettore virale e' presente e funzionale. Di conseguenza, i recettori virali determinano il tropismo virale. Questo modello semplificato e' tuttavia spesso insufficiente per spiegare il tropismo virale dal momento che la distribuzione del recettore nell'ospite e' spesso piu' generale in confronto al tropismo virale che viene osservato.

Nelle infezioni influenzali, il sito di legame al recettore dell'emagglutinina virale (HA) e' necessario per il legame all'acido sialico, legato al galattosio, sulla superficie delle cellule dell'ospite (Weis 1988). Certe aree del sito di legame di HA sono altamente conservate tra i sottotipi del virus dell'influenza (Daniels 1984). L'ospite puo' prevenire il legame per via di vari meccanismi: (1) risposta immunitaria specifica e secrezione di anticorpi IgA specifici, (2) meccanismi non specifici, come pulizia mucociliare o produzione di mucoproteine che si legano all'emagglutinina virale, e (3) diversificazione genetica del recettore nell'ospite (acido sialico), che e' altamente conservato nella stessa specie ma che varia fra recettori aviari e umani (Matrosovich 2000). Da tutto questo risulta che il virus aviario deve sottoporsi a mutazioni nel sito di legame al recettore

dell'emagglutinina per poter sorpassare la barriera fra le specie aviaria e umana. Nei suini, i tessuti coesprimono i polimorfismi delle specie di acido sialico e il legame al galattosio sia degli esseri umani che degli uccelli. Di conseguenza, nei maiali e' possibile la coinfezione con influenza umana e aviaria con un possibile riassortimento nelle cellule co-infette delle proprieta' antigeniche di entrambe le specie. Recentemente, e' stato dimostrato che certi virus aviari dell'influenza in esseri umani e in uccelli sono in grado di legarsi a diverse cellule bersaglio (Matrosovich 2004). Questo potrebbe spiegare l'osservazione in parecchi casi dalla fine degli anni 90, di trasmissione di influenza aviaria direttamente dal pollame agli esseri umani. H5N1 e altri sottotipi di virus A dell'influenza sono in grado di legarsi a recettori nell'occhio umano (Olofson 2005).

Cosi' come e' essenziale il legame del virus dell'influenza al recettore tanto lo e' la sua scissione dal sito di legame sulla cellula ospite. La neuraminidasi virale ha come funzione la scissione dal sito (Chen 1998). La virulenza del virus dell'influenza dipende dalla compatibilita' della neuraminidasi con l'emagglutinina. Un virus virulento che ha subito mutazioni nell'emagglutinina, richiede mutazioni compensatorie nella neuraminidasi per mantenere la virulenza (Baigent & McCauley 2003, Hulse 2004). Di conseguenza, e' stato notato che la fitness virale e la virulenza possono essere ridotte in virus dell'influenza resistenti agli inibitori della neuraminidasi (Yen 2005).

Una volta che la membrana cellulare e il virus sono posti in giustapposizione tramite l'interazione del virus con il recettore, il complesso viene ingolfato via endocitosi. L'interno della vescicola endocitotica viene successivamente acidificato a causa di eventi fisiologici che includono l'importazione di ioni H^+ all'interno delle vescicole endocitotiche. Dopo acidificazione, l'HA virale viene sottoposta a riarrangiamento conformazionale che produce una proteina fusogenica. La regione a cappio dell'HA diventa una spirale avvolta su se' stessa che porta le membrane virali ed endosomali ad avvicinarsi in modo da facilitarne la fusione. Per permettere il rilascio dell'RNA virale nel citoplasma, gli ioni H^+ dell'endosoma acidico vengono pompati all'interno del virione via i canali ionici M2. Come risultato, dopo la fusione delle membrane virali ed endosomali l'interazione tra M1 e il complesso ribonucleoproteico, sensibile a livelli di pH bassi, viene distrutta, e l'RNA virale si dissocia dalla proteina M1. L'RNA virale viene quindi importato in maniera ATP-dipendente, al nucleo per la trascrizione e la traduzione (Flint 2004).

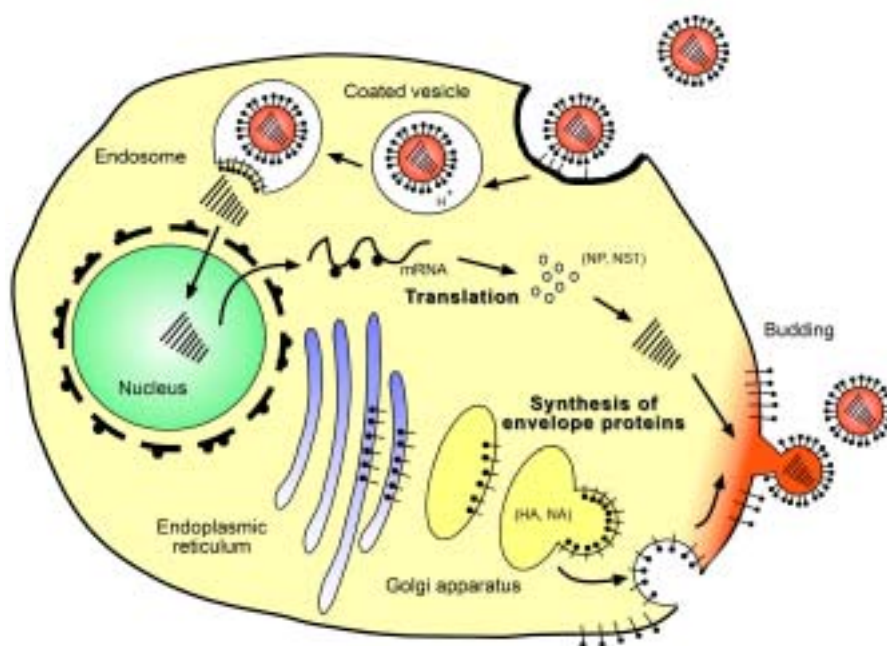



Figura 2: ciclo di replicazione del virus A dell'influenza. Legame ed ingresso del virus, fusione con membrane endosomali e rilascio dell'RNA virale, replicazione all'interno del nucleo, sintesi di proteine strutturali e dell'involucro, budding e rilascio di virioni in grado di infettare cellule epiteliali vicine. (Modificato da Cox & Kawaoka 1997)

Dove accade la replicazione primaria?

Proteasi cellulari sono spesso necessarie per tagliare le proteine virali in modo da formare particelle virali infettive. Di conseguenza, altri fattori oltre ai recettori di ingresso possono determinare il sito di replicazione virale. Negli esseri umani la replicazione del virus dell'influenza e' generalmente ristretto alle cellule epiteliali del tratto respiratorio superiore ed inferiore. Questo e' dovuto all'espressione limitata della serino proteasi, triptasi Clara, secreta dalle cellule Clara non ciliate dell'epitelio bronchiale. L'enzima purificato taglia il polipeptide precursore della catena HA, HA0 delle particelle extracellulari e attivate l'HA nei virioni, rendendoli infettivi. Certi ceppi dell'influenza aviaria altamente virulenti, tuttavia, contengono inserzioni genetiche al sito di scissione dell'HA che risultano nel processamento da parte di proteasi ubiquitarie. Questo puo' causare tropismo alterato e siti di replicazione addizionali in animali e in esseri umani (Gamblin 2004). Il tropismo dell'influenza aviaria (H5N1) nei tessuti umani non e' ben definito. In un caso, RNA virale venne trovato in polmoni, intestino, e milza tramite reverse transcription polymerase chain reaction, ma RNA virale di segno positivo, che indica replicazione del virus, venne rivelato esclusivamente nei polmoni e nell'intestino (Uiprasertkul 2005). Quindi, la replicazione virale di H5N1 negli esseri umani potrebbe essere ristretto ai sistemi respiratorio e digestivo, in contrasto alle infezioni disseminate documentate in altri mammiferi e in uccelli.

Come si dissemina l'infezione nell'ospite?

Una volta che l'influenza ha infettato efficientemente le cellule epiteliali del tratto respiratorio, la replicazione accade entro alcune ore e numerosi virioni vengono prodotti. Le particelle infettive vengono rilasciate all'interno delle vie respiratorie preferenzialmente dalla membrana apicale delle cellule epiteliali tramite il processo noto come budding (germinazione). Questo favorisce la disseminazione veloce del virus all'interno dei polmoni a causa dell'infezione rapida delle cellule vicine.

L'alterazione del sito di scissione nella HA in mutanti che occorrono in natura, puo' influenzare in modo drammatico il tropismo e la patogenicita' dell'influenza. Come risulatato, il sito puo' venire riconosciuto da altre proteasi cellulari. Questo potrebbe spiegare perche' molti individui infetti con il virus dell'influenza aviaria (H5N1) in Hong Kong mostrarono sintomi di tipo gastrointestinale, epatico e renale cosi' come respiratorio ed il motivo per cui i virus ottenuti da questi pazienti si rivelarono neovirulenti nei topi (Park 2002). Rimane da verificare se questi sintomi furono il risultato di disseminazione ematogenica o il risultato di ingresso virale non polmonare nell'ospite. Tuttavia, mutazioni nell'NA possono anche, in parte, spiegare la natura pantropica dell'influenza. Per esempio, il ceppo dell'influenza derivato in laboratorio WSN/33, una variante del primo virus dell'influenza umana che sia mai stato isolato, al contrario della maggior parte dei ceppi del virus dell'influenza umana, puo' replicarsi in vitro senza bisogno di aggiunta di tripsina. In questo virus una delezione in frame che rimuove il sito di glicolizzazione al residuo 46 dell'NA permette alla neuroaminidasi di legare e sequestrare il plasminogeno. Questo porta ad un'aumentata concentrazione localizzata di questo precursore delle proteasi e di conseguenza ad una aumentata scissione dell'HA. Questi risultati suggeriscono un modo per cui i virus A dell'influenza, cosi' come forse altri virus, possano diventare altamente patogenici negli esseri umani (Goto & Kawaoka 1998). E' interessante notare che studi con il virus pandemico dell'influenza spagnola del 1918 (H1N1) hanno rivelato meccanismi addizionali che favoriscono la scissione di HA mediata da NA che potrebbero essere rilevanti alla replicazione e virulenza di quel virus (Tumpey 2005).

Infine, studi animali hanno rivelato che il sito di inoculazione puo' determinare la via di disseminazione del virus dell'influenza nell'ospite. Ad esempio, il ceppo neurotropico NWS si dissemina al cervello per via ematogenica quando somministrato intraperitonealmente, ma raggiunge il sistema nervoso centrale tramite i neuroni sensoriali quando l'inoculo del virus e' inseriito nel naso (Flint 2004). Questo e' stato dimostrato anche nel caso del virus H5N1 di Hong Kong (Park 2002).

Qual'e' la risposta iniziale dell'ospite?

Nonostante sia una malattia frequente, i pattern specifici dell'infiammazione o la regolazione della risposta infiammatoria nell'influenza umana non sono completamente chiari. La maggior parte dell'evidenza e' derivata da studi animali, dove l'influenza aviaria e' una malattia disseminata. La patofisiologia di tali modelli, tuttavia, puo' essere profondamente diversa da quella umana.

Febbre e citochine

Una domanda fondamentale e' come un'infezione localizzata essenzialmente al tratto respiratorio possa produrre sintomi costituzionali cosi' severi. Cosi' come in molte altre malattie infettive, sono la risposta immunitaria non specifica e adattativa che contribuiscono in maniera sostanziale ai segni clinici e ai sintomi dell'influenza e infine al controllo dell'infezione. Questi meccanismi immunitari possono portare ad effetti sia sistemici che localizzati. Le citochine, prodotte rapidamente dopo l'infezione dalle cellule epiteliali e dalle cellule immunitarie della mucosa respiratoria, sono ormoni che agiscono localmente e che attivano altre cellule, specialmente quelle del sistema immunitario. Le chemochine sono un sottogruppo delle citochine e agiscono come chemoattrattori per le cellule del sistema immunitario. Ad esempio, l'infezione con influenza induce, nei plasmacitoidi e nelle cellule dendritiche di origine mieloide umane, un programma di secrezione di chemochine che permette un'attrazione coordinata dei diversi effettori immunitari (Piqueras 2005, Schmitz 2005). Le citochine piu' importanti servono come pirogeni endogeni e sono coinvolte nella patogenesi febbrile: IL-1α/β, TNF α/β, IL-6, interferone (IFN) α/γ, IL-8, e la proteina infiammatoria macrofagica (MIP)-1α.

La maggior parte di queste citochine e' stata trovata in lavaggi nasofaringei di persone che sono state infettate con influenza sia naturalmente che sperimentalmente (Brydon 2005). E' stato proposto che queste citochine, prodotte localmente o sistemicamente successivamente all'interazione di pirogeni esogeni (ad esempio influenza) con i fagociti, raggiungono il sistema nervoso centrale. Esiste una piccola area nell'ipotalamo, chiamata Organum vasculosum laminae terminalis, che presenta una barriera emato-encefalica ridotta e permette il passaggio di pirogeni. In questo sito, in maniera dose dipendente, le citochine inducono la produzione di prostaglandine e specialmente di prostaglandina E2. Questi mediatori aumentano il punto di regolazione termostatico e iniziano complessi meccanismi termoregolatori che aumentano la temperatura corporea. Il fatto che nessuna delle citochine sopracitate si correla positivamente con la severita' della malattia nell'influenza, porta a favorire la teoria della loro pleiotropia e del loro ruolo nello scambio di segnali tra diverse sequenze metaboliche.

La rilevanza delle citochine puo' anche essere diversa a seconda del ceppo di influenza o in diversi individui. Le infezioni influenzali con il ceppo di Hong Kong H5N1 del 1997 sono state proposte come potenti produttori di citochine pro-infiammatorie (particolarmente TNFα) che vengono secrete in risposta ai prodotti del gene NS (Cheung 2002, Lipatov 2005, Chan 2005). Studi mirati ad identificare altri componenti dei virioni che inducono il rilascio di citochine, hanno mostrato che l'RNA a doppia spirale (dsRNA), sia da polmoni di topi infetti con influenza che derivato sinteticamente dall'influenza, sono pirogenici dopo iniezione nel ventricolo del CNS di topi. Tale dsRNA viene rilasciato da cellule infette quando muoiono e quindi puo' stimolare la produzione di citochine. Studi recenti indicano che cellule epiteliali polmonari esprimono recettori Toll-like 3 (TLR3) che sono sensibili al dsRNA e che i TLR3 contribuiscono direttamente alla risposta immunitaria delle cellule epiteliali nel sistema respiratorio (Guillot 2005, Akira & Takeda 2004). E' interessante notare che, negli esseri umani l'inizio della risposta immunitaria innata contro l'influenza sembra sia almeno tanto dipendente dalla attivazione di TLR8, sensibile all'RNA a singola elica, quanto dall'attivazione di TLR3 causata da dsRNA. Le particelle virali possono anch'esse esser pirogeniche dal momento che virosomi privi di RNA ma contenenti lipidi virali, emagglutinina

e neuraminidase, possono indurre la febbre. Componenti individuali di virioni, tuttavia, si mostrarono non pirogenici, il che potrebbe spiegare il motivo per cui vaccini che consistono di virus intero possono produrre sintomi simili all'influenza, mentre vaccini costituiti da subunita' no (Brydon 2005).

Sintomi respiratori

Sintomi comuni nell'influenza sono: iperreattivita' del sistema bronchiale (Utell 1980, Little 1978), ostruzione delle piccole vie respiratorie (Hall 1976) e limitata capacita' di diffusione (Horner 1973). Iperreattivita' e ostruzione bronchiale possono persistere per un lungo periodo, specialmente nella malattia allergica, e possono' risultare dal profilo pro-infiammatorio delle citochine che interferisce con l'abilita' ad indurre tolleranza agli allergeni presenti nell'areosol (Tsitoura 2000).

Nell'influenza umana l'infiammazione grave degli alveoli, che si presenta come polmonite virale primaria, e' rara. Normalmente si presenta con infiammazione estesa nei tratti superiori ed inferiori del sistema respiratorio, risulta nella perdita di cellule ciliate e porta a membrane ialine iperemiche o emorragiche e ad infiltrati di neutrofili e cellule mononucleari (Yeldandi & Colby 1994).

Contrariamente alla polmonite virale primaria, nell'influenza umana e' comune la superinfezione batterica che causa grave morbidita' e mortalita' prevalentemente in giovani adulti. Numerosi fattori sono stati identificati che possono spiegare il maggior rischio di infezione batterica del sistema respiratorio ed includono il danno alle cellule colonnari epiteliali con conseguente distruzione della barriera cellulare epiteliale (Mori 1995), inferiore eliminazione da parte del sistema mucociliare (Levandovsi 1985), aumentata aderenza batterica (McCullers 2002), e alterazione funzionale dei neutrofili (Abramson 1986, Cassidy 1988).

Effetti citopatici

L'influenza umana porta a complessi effetti citopatici, prevalentemente nelle cellule colonnari epiteliali del tratto respiratorio, che risultano in malattia acuta dei polmoni e delle vie respiratorie. L'infezione e la replicazione del virus dell'influenza nel sistema respiratorio porta a danno cellulare indotto dalla riduzione della sintesi proteica nella cellula ospite (Katze 1986, Sanz-Esquerro 1995) e apoptosi (Wiley 2001a). Quest'ultima, nota anche come morte cellulare programmata, consiste in una serie di eventi cellulari ben definiti che risulta in un'efficiente rimozione della cellula e del suo contenuto. L'apoptosi puo' essere iniziata da diversi meccanismi ed e' caratterizzata da numerosi cambi morfologici che includono la distruzione del citoscheletro, la condensazione del citoplasma e della cromatina, perdita delle funzioni mitocondriali, frammentazione del DNA, e infine la formazione di piccole particelle circondate da membrana note come corpi apoptotici, che vengono eliminati da cellule fagocitiche come i macrofagi e le cellule dendritiche .

L'apoptosi indotta dal virus dell'influenza e' mediata sia da meccanismi Fas-dipendenti sia da segnali Fas- indipendenti, come la formazione di complessi FADD/caspasi-8 indotti da protein chinasi R (PKR) che incomincia una cascata della caspasi. La PKR e' un componente chiave nella regolazione di molte sequenze metaboliche relative all'apoptosi ed e' essa stessa indotta da IFN ed attivata da dsDNA (Brydon 2005). Come terza via che porta ad apoptosi, l'influenza attiva il fattore di crescita trasformatore (TGF)-β via neuraminidasi virale. NA puo' attivare TGF-β latente sulla superficie cellulare mediante la facilitazione della scissione di

TGF-β nella sua forma attiva. TGF-β inizia una cascata di segnali che portano all'attivazione della chinasi N-terminale c-Jun (JNK) o della protein chinasi attivata da stress (SAPK), che risulta nella attivazione di fattori di trascrizione e in un'aumentata espressione dei geni pro-apoptotici. Questa via metabolica, insieme agli effetti sulla stabilita' di una piccola proteina sulla membrana mitocondriale, codificata da un reading frame alternativo +1 del gene della proteina PB1 (Chen 2001), e' stata implicata nell'apoptosi di linfociti e potrebbe spiegare la linfopenia osservabile durante l'infezione acuta.

Danno dei tessuti polmonari conseguente ad infezione con il virus dell'influenza e' stato associato con stress ossidativo cellulare, generazione di specie di ossigeno altamente reattive (ROS), e induzione di nitric oxide sintetasi-2 che porta alla formazione di intermediati dell'azoto altamente reattivi e tossici. Gli antiossidanti, tuttavia, mostrano poca efficacia contro l'apoptosi in linee cellulari bronchiali *in vitro*.

Sintomi dell'infezione da H5N1

L'influenza aviaria e' una malattia infettiva degli uccelli causata da ceppi di tipo A del virus dell'influenza. Fino ad oggi tutte le epidemie della forma altamente patogenica sono state causate da virus A dell'influenza sottotipo H5 e H7. E' al momento ignoto se l'influenza aviaria negli esseri umani (H5N1) presenti gli stessi effetti citopatici menzionati in precedenza. Sono stati condotti solamente pochi studi di casi gravi o fatali. Tuttavia, e' possibile una malattia lieve o asintomatica (Buxton Bridges 2000, Katz 1999) e la sua incidenza potrebbe essere sottostimata.

I sintomi iniziali piu' comuni dell'influenza causata da H5N1 negli esseri umani sono stati febbre alta, e, in quei pazienti ospitalizzati, polmonite, faringite, sintomi intestinali, congiuntivite, ed encefalite acuta (Yuen 1998, Tran 2004, Yuen & Wong 2005). In pazienti adulti con sintomi iniziali di polmonite spesso la malattia e' progredita verso malattia simile ad ARDS. In casi mortali di influenza H5N1, e' stata descritta come caratterisca predominante la sindrome reattiva emofagocitica. Oltre alla malattia polmonare che presenta danno alveolare organizzato e diffuso e fibrosi interstiziale, e' stato descritto anche un coinvolgimento extrapolmonare che comprende necrosi estensiva del lobulo centrale epatico, necrosi acuta tubulare renale e deplezione linfoidale (To 2001) sebbene non e' stata riscontrata la presenza di virus negli isolati la presenza del virus venne confermata tramite RT-PCR e immunostaining rispettivamente. E' stato possibile mostrare livelli aumentati per il recettore solubile dell'interleuchina-2, interleuchina-6 e interferone-gamma. In aggiunta, mRNA per TNF-α e' stato rilevato in tessuti polmonari in altri casi di pazienti con influenza da H5N1 (Uiprasertkul 2005).

In confronto ai virus umani H1N1, il ceppo di Hong Kong H5N1 del 1997 e' stato proposto come un potente induttore di citochine pro-infiammatorie incluse IL-10, IFNβ, RANTES, IL-6 e in particolare TNFα tramite i prodotti del gene NS. Gli autori di questi studi hanno postulato che in un'infezione umana fatale con il sottotipo aviario H5N1, a replicazione virale iniziale nel sistema respiratorio puo' indurre ipercitochinemia complicata da sindrome reattiva emofagocitica, e questa potrebbe essere una patogenesi diversa dall'infezione da influenza A H5N1 degli usuali sottotipi umani (To 2001). Non e' stata trovata superinfezione batterica nei casi fatali di influenza aviaria H5N1 (To 2001). Questa osservazione potrebbe essere influenzata dal fatto che nei casi gravi precocemente fatali, la superinfezione non ha avuto teoricamente il tempo di svilupparsi.

Come si trasmette l'influenza alle altre persone?

La trasmissione respiratoria dipende dalla produzione di particelle trasportate dall'aria e di areosol contenenti virus. Areosol vengono prodotti mentre si parla e durante la respirazione normale. La dispersione dalle cavita' nasali richiede che la persona starnutisca ed e' molto piu' efficace se l'infezione produce secrezioni nasali. Uno starnuto produce fino a 20,000 gocce di piccole dimensioni, mentre un colpo di tosse ne espelle qualche centinaio. Le gocce di dimensioni maggiori cadono al suolo nello spazio di pochi metri. Le gocce rimanenti viaggiano a distanze che dipendono dalla loro dimensione. Gocce che misurano 1-4 µm in diametro possono rimanere sospese per un lungo periodo di tempo e raggiungere il tratto respiratorio inferiore. La trasmissione sperimentale dell'influenza in volontari ha mostrato che l'inalazione bronchiale di piccole gocce e' superiore rispetto all'inoculo di gocce di dimensioni maggiori nel tratto respiratorio superiore o nella congiuntiva (Alford 1966, Little 1979, Bridges 2003). Se il virus si replica precocemente durante il corso dell'infezione nel tratto respiratorio inferiore, questo risulta in gocce piu' piccole con maggior contenuto virale e maggiore infettivita', perche' l'immunosorveglianza specifica non e' ancora stabilita. La trasmissione di H5N1 da animali ad esseri umani puo' occorrere in modo diverso per contatto diretto (e indiretto) con pollame infetto.

Sono necessarie alti tassi di contagio perche' l'influenza A provochi epidemie. Di conseguenza le epidemie durante l'inverno in Europa e in Nord America possono essere spiegate come conseguenza di contatto ravvicinato e permanenza in stanze non abbastanza ventilate (Hemmes 1960). Il virus dell'influenza e' ben adattato: per ragioni non note la sua abilita' di sopravvivenza e' al meglio in condizioni di bassa umidita' relativa e di temperature ambientali basse. L'influenza aviaria (H5N1) potrebbe essere meno adattata alla trasmissione per gocce: il periodo di incubazione e' piu' lungo (Chotpitayasunondh 2005) il che, teoricamente, risulta in un minore sviluppo contemporaneo in piu' persone durante un'epidemia. La repilcazione intestinale e i sintomi precedono le manifestazioni respiratorie fino ad una settimana (Apisarnthanarak 2004), permettendo lo sviluppo di risposte immunitarie specifiche prima che la divulgazione per gocce si possa sviluppare. Di conseguenza, la replicazione nasofaringea nell'influenza aviaria e' minore rispetto a quella dell'influenza umana (Peiris 2004), ma la replicazione virale e' prolungata (Beigel 2005). Fino ad'ora la trasmissione di H5N1 fra esseri umani e' stata rara (Buxton Bridges 2000, Ungchusak 2005) e abbastanza inefficiente. In conclusione, e' presumibile che il virus aviario dell'influenza (H5N1) richieda svariati passaggi per essere in grado di promuovere trasmissione da umano ad umano e per raggiungere un tasso di infettivita' che sia sufficiente per generare un'epidemia o una pandemia.

Immunologia

L'influenza provoca infezione acuta nell'ospite e da' il via ad una cascata di reazioni immunitarie che attivano quasi tutte le parti del sistema immunitario. La maggior parte della risposta innata iniziale, che include il rilascio di citochine (IFNα/β), l'influsso di granulociti neutrofili o cellule natural killer (Mandelboim 2001, Achdount 2003), e attivazione cellulare, e' responsabile per l'inizio dei sintomi clinici acuti (vedi sopra). L'immunita' innata e' un prerequisito essenziale per la risposta immunitaria acquisita, inizialmente per limitare la replicazione virale e il

carico di antigene e, secondariamente, perche' i linfociti specifici per gli antigeni della risposta acquisita sono attivati da molecole co-stimolatrici che sono indotte dille cellule del sistema immunitario innato durante la loro interazione con il virus (Figura 3). I virus dell'influenza, tuttavia, codificano nella proteina non strutturale 1 (NS1) meccanismi per l'evasione e antagonizzano la risposta IFN α/β. E' possibile che NS1 sequestri il dsRNA virale prevenendo cosi' il riconoscimento di questa molecola pericolosa da parte di sensori cellulari che altrimenti inizierebbero il rilascio di IFN α/β (Garcia-Sastre 1998, Garcia-Sastre 2005).

La risposta immunitaria acquisita richiede qualche giorno per diventare effettiva, ma successivamente aiuta nel contenimento della diffusione del virus, nell'eradicazione del virus e, infine, nello stabilire una risposta con memoria che conferisce resistenza a lungo termine contro infezione con virus omologo. La protezione incrociata contro un sottotipo di influenza e' stata osservata solo raramente e le infezioni essenzialmente non inducono protezione tra sottotipi o tra tipo A e B (Treanor 2005). L'infezione con influenza induce sia anticorpi a livello dell'intero organismo sia anticorpi locali, cosi' come risposte citotossiche delle cellule T (immunita' cellulare), ognuna delle quali e' importante nel recupero da infezione acuta e nella resistenza a reinfezione.

La risposta immunitaria umorale

I linfociti B dopo aver riconosciuto un antigene ed essere stati stimolati dalle cellule T CD4 o da citochine derivate da cellule T, si trasformano in plasmacellule che rappresentano lo stadio finale di sviluppo delle cellule B e che producono anticorpi (ad esempio IgG, IgA) (Figura 3). Al contrario delle cellule T, le cellule B possono riconoscere antigeni nella loro forma originale. La specificita' verso gli antigeni risulta da un riarrangiamento casuale nelle cellule di geni che codificano per la regione ipervariabile delle immunoglobuline, quando si trovano ancora nel midollo osseo. Successivamente le cellule B naïve entrano in circolazione e raggiungono attraverso la circolazione sanguigna e i vasi linfatici i tessuti e gli organi linfoidi. Nei linfonodi, le cellule B naïve riconoscono antigeni simili attraverso il loro anticorpi di superficie, diventano attivate, passano dalla produzione di IgM alla produzione di IgG (passaggio di classe), aumentano la specificita' e affinita' delle loro immunoglobuline e si differenziano in plasmacellule o cellule B della memoria che si dividono in presenza di citochine. Mentre le IgA vengono trasportate alle vie respiratorie superiori tramite l'epitelio della mucosa, dove servono per neutralizzare ed eliminare l'infezione virale, le IgG sono principalmente responsabili per la protezione del tratto respiratorio inferiore (Palladino 1995, Renegar 2004).

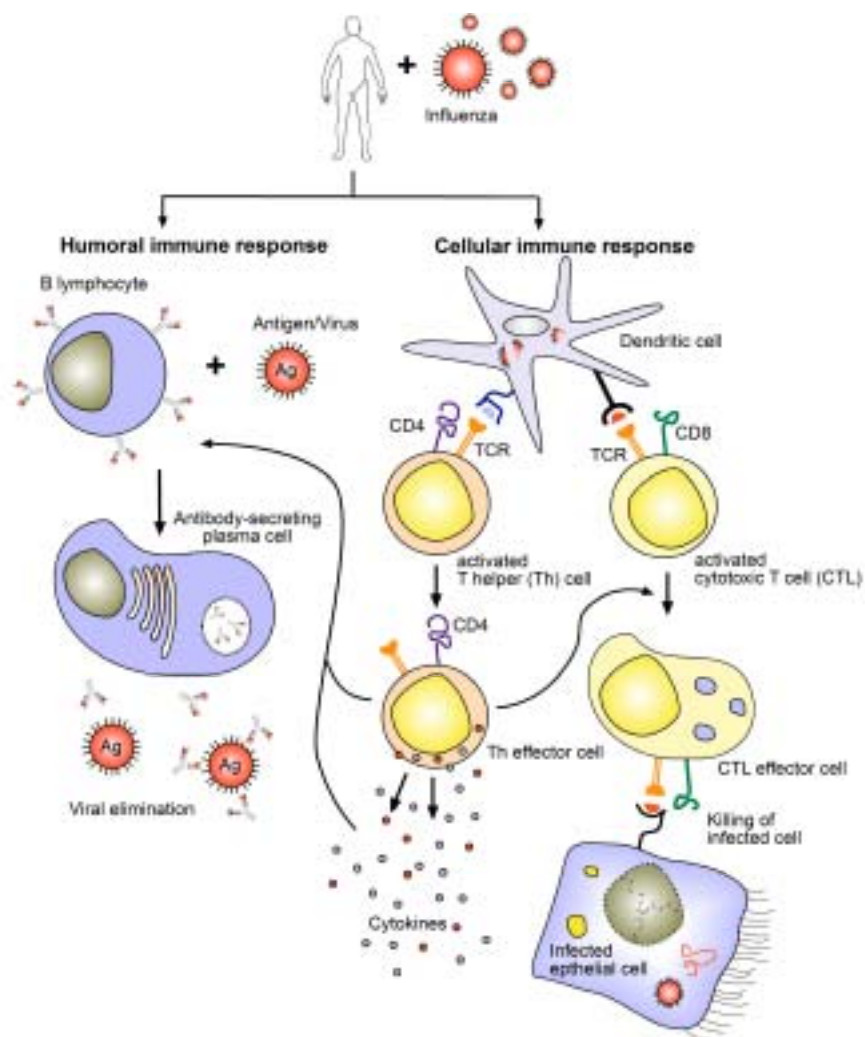



Figura 3. la risposta immune umorale e cellulo-mediata nell'infezione con virus dell'influenza. Il braccio umorale del sistema immunitario include linfociti B (*a sinistra)* che dopo interazione con l'influenza si differenziano in plasmacellule che secernono anticorpi. La risposta cellulare (*a destra)* inizia con la presentazione dell'antigene tramite le molecole MHC I (in nero) e II (in blu) delle cellule dendritiche, che in successione porta all'attivazione, proliferazione e differenziazione di cellule T antigene-specifiche (CD4 O CD8). Queste cellule acquisiscono la funzione di cellule effettrici aiutando direttamente, rilasciando citochine, o mediano la citotossicita' in seguito al riconoscimento di antigeni (Adapted from Flint 2004). La formazione della memoria cellulare e le varie forme di immunita' adattativa indotte da influenza non sono mostrate.

L'infezione con influenza risulta nella produzione sistemica di anticorpi contro le glicoproteine HA e NA dell'influenza, cosi' come contro le proteine M e NP. Per esempio, immunoglobuline specifiche contro HA, comprese IgM, IgA e IgG, appaiono 2 settimane dopo l'inoculo con il virus. Lo sviluppo di anticorpi anti-Na e' parallelo a quello di anticorpi che inibiscono l'emagglutinina. Il picco del titolo degli anticorpi si verifica da 4 a 7 settimane dopo l'infezione, ed e' seguito da un declino costante. Gli anticorpi restano ad un livello riscontrabile per anni dopo l'infezione anche senza riesposizione. Gli anticorpi anti-HA proteggono sia contro la malattia che contro l'infezione con virus omologhi, e l'induzione di anticorpi neutralizzanti e' uno degli effetti piu' desiderabili nell'immunizzazione con vaccini. Titoli nel siero di HA-inibitori pari a 1:40 o superiori, o titoli nel siero neutralizzanti pari a 1:8 o superiori, sono considerati protettivi contro l'infezione. Livelli maggiori di anticorpi sono richiesti per la protezione in individui anziani (Treanor 2005).

Al contrario degli anticorpi anti-HA, gli anticorpi anti-NA non neutralizzano l'infettivita' del virus, ma invece riducono l'efficacia di rilascio del virus da cellule infette (Johansson 1989). Questo a causa del fatto che la neuraminidasi taglia i residui di acido sialico del recettore cellulare a cui si attaccano le particelle vrali di nuova formazione. Anticorpi anti-NA possono proteggere contro la malattia e hanno come risultato un minore rilascio di virus e una minore gravita' dei sintomi. Effetti simili sono stati proposti per gli anticorpi anti-M2 dell'influenza A sebbene, in generale, anticoripi contro antigeni intracellulari non sono neutralizzanti, spariscono piu' rapidamente e non sembra che abbiano un ruolo nell'immunita' protettiva.

La risposta immunitaria della mucosa, misurata nelle secrezioni nasali, e' caratterizzata dalla presenza di IgA e IgG1 contro HA. I livelli mucosali di IgG anti-HA sono ben correlati con i rispettivi livelli nel siero, il che indica una diffusione passiva dal compartimento sistemico, mentre le IgA vengono prodotte localmente. Studi suggeriscono che la resistenza alla reinfezione e' mediata principalmente da IgA HA-specifiche prodotte localmente sebbene anche le IgG potrebbero essere importanti (Renegar 2004). Sia gli anticorpi sistemici che quelli mucosali possono essere singolarmente protettivi se sono presenti in concentrazioni sufficienti, e una protezione ottimale occorre quando sono presenti sia anticorpi nasali che del siero (Treanor 2005). L'azione degli anticorpi contro l'influenza avviene tramite neutralizzazione del virus o lisi delle cellule infette tramite complemento o tossicita' cellulare anticorpo-dipendente.

Gli ospiti che sopravvivono un'infezione acuta con il virus e che lo eliminano sono in generale immuni ad infezioni con lo stesso virus. Ciononostante, infezioni acute causate dall'influenza accadono ripetutamente, anche in seguito ad una eliminazione da parte di un attivo sistema immunitario. Questo perche' l'influenza presenta plasticita' strutturale dal momento che puo' tollerare numerose sostituzioni amminoacidiche nelle sue proteine strutturali, senza perdere di infettivita'. Un esempio e' la molecola HA che si lega al recettore acido sialico, che e' responsabile per l'ingresso del virus nelle cellule bersaglio, e che essendo anche uno dei maggiori bersagli degli anticorpi neutralizzanti e dei linfociti T citotossici, e' sotto ad una continua pressione immunologica. Questa selezione immunologica o diversita', che origina da errori di copiatura, risulta nel tempo in piccole variazioni in HA che permettono al virus di evadere le risposte immunitarie umane (antigenic drift). Questi cambi sono alla base delle epidemie stagionali dell'influenza e causano la

necessita' di formulare nuovi vaccini prima di ogni epidemia annuale. In contrasto, antigenic shift consiste in un cambio sostanziale nelle proteine di superficie di un virione, dal momento che geni che codificano per proteine di superficie completamente nuove originano dopo ricombinazione o riassortimento di genomi o di segmenti del genoma. Antigenic drift e' possibile ogni volta che un genoma viene replicato. Al contrario, antigenic shift e' possibile solamente in certe circostanze, e' relativamente raro ed e' la ragione piu' probabile per le pandemie.

La risposta immuntaria cellulare

E' stato dimostrato che le cellule dendritiche giocano un ruolo centrale nell'iniziare e nel guidare le risposte dei linfociti T. Sono distribuite sporadicamente, e sono un gruppo di leucociti migratori originati nel midollo osseo specializzati nella raccolta, nel trasporto, nel processamento e nella presentazione di antigeni alle cellule T (Figura 3). Il paradigma e' che le cellule dendritiche acquisiscono l'antigene dal patogeno che invade l'organismo, diventano attivate e successivamente raggiungono i linfonodi di drenaggio locali (Legge & Braciale 2003). Il campione antigenico viene processato e fissato sulla superficie delle cellule dendritiche sotto forma di peptidi che sono presentati da molecole del complesso di istocompatibilita maggiore (MHC) (Silver 1992). Nei linfonodi, le cellule dendritiche mature iniziano in maniera efficiente una risposta immunitaria in ogni cellula T con un recettore che sia specifico per il complesso peptide-estraneo-MHC presente sulla superficie della cellula dendritica (Shortman & Liu 2002). Antigeni endogeni derivati dall'infezione di cellule dendritiche sono processati e presentati a cellule T CD8 da molecole dell'MHC I. Antigeni esogeni sono presentati da molecole dell'MHC II a linfociti T CD4. Alternativamente, le cellule dendritiche possono presentare antigeni che hanno raccolto da cellule infette, o possono trasferire l'antigene a cellule dendritiche vicine nel linfonodo iniziando una risposta delle cellule T CD8 in un processo che viene chiamato di presentazione incrociata (cross-presentation) (Belz 2004, Heath 2004, Wilson 2006). Le cellule T cosi' attivate acquisiscono le funzioni di cellule effettori e migrano al sito di infezione nei polmoni dove mediano le loro attivita' antivirali (Figura 3).

In seguito a recupero dopo un'infezione, si stabilisce uno stato di memoria immunitaria in cui l'individuo e' meglio equipaggiaro a controllare un'infezione successiva con lo stesso patogeno (Ahmed & Gray 1996). La memoria viene mantenuta da cellule T antigene-specifiche che persistono con aumentata frequenza, hanno minor necessita' di segnali co-stimolatori in confronto a cellule T naïve, e rispondono velocemente a ri-stimolazione da antigene (Woodland & Scott 2005). C'e' anche evidenza in favore di un' accumulazione nei polmoni umani di cellule T CD8 della memoria specifiche contro l'influenza che conferirebbero protezione immunologica immediata contro reinfezione polmonare (de Bree 2005, Wiley 2001b). Durante l'infezione con influenza, sottogruppi di cellule T della memoria sia CD4 che CD8 rispondono a, e mediano il controllo di una reinfezione con il virus dell'influenza, il che e' in contrasto a cio' che avviene nell'infezione primaria in cui l'eliminazine del virus dipende da linfociti T CD8 (Woodland 2003).

Un'altra caratteristica importante nell'infezione con influenza e' che i linfociti T CD4 aiutano i lilnfociti B a produrre anticorpi anti-HA e anti-NA (Figura 3). Gli epitopi riconosciuti nella HA dalle cellule helper CD4 sono distinti da quelli

riconosciuti dagli anticorpi. Le cellule T helper (Th) possono anche promuovere la generazione di linfociti T CD8 citotossici. Cellule Th possono essere suddivise ulteriormente in cellule Th1 e Th2, sulla base delle citochine che producono. In topi, l'infezione con influenza induce una forte risposta Th1, ma sono anche state trovate nei polmoni di animali infetti le citochine Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Esiste una certa evidenza che indica che l'immunita' protettiva e' mediata da risposte tipo Th1. Nell' infezione con influenza, linfociti T citotossici CD8 (CTL) riconoscono epitopi nell'HA o nelle proteine interne M, NP o PB2 che sono presentate sulle molecole MHC di classe I (Treanor 2005). In concomitanza con la loro specificita' antigenica, le cellule CTL possono essere sottotipo-specifiche o, se riconoscono antigeni interni, generalmente a reattivita' incrociata con l'influenza A. Esperimenti su animali che usano il trasferimento adottivo di CTL hanno rivelato il loro pattern di proliferazione e migrazione durante l'infezione (Lawrence & Braciale 2004, Lawrence 2005) e il loro potenziale nel mediare il recupero da infezione influenzale. Queste cellule, tuttavia, non sono assolutamente indispensabili nel controllo dell'influenza.

Le risposte dei linfociti in esseri umani raggiungono il loro picco a circa 14 giorni dall'infezione e i livelli di CTL influenza-specifici sono correlati ad una riduzione nella durata e nel livello di replicazione del virus negli adulti. Le cellule T della memoria CD8 possono avere un ruolo nel miglioramento della severita' della malattia e nel facilitare il recupero durante reinfezione. Studi recenti in animali suggeriscono che il richiamo della risposta nei polmoni e' composto da numerose fasi distinte che sono temporaneamente ed anatomicamente separate. La prima fase e' mediata dalle cellule T della memoria che sono residenti nelle vie respiratorie polmonari (Woodland & Randall 2004). E' importante notare che queste cellule sono in grado di rispondere ai primi segnali di infezione quando il carico virale e' ancora molto basso. Nonostante non siano in grado di proliferare in risposta all'infezione a causa delle restrizioni dell'ambiente nelle vie respiratorie, possono produrre citochine che possono limitare la replicazione virale e diffondere nell'epitelio. La seconda fase della risposta e' mediata da cellule T della memoria che sono rapidamente reclutate nelle vie respiratorie nei giorni iniziali della risposta. Il terzo stadio consiste nell'espansione, guidata dagli antigeni, delle cellule T della memoria che avviene negli organi linfatici secondari. Queste cellule della memoria proliferano per giorni negli organi linfatici e vengono reclutate nelle vie respiratorie polmonari solo dopo 5 giorni dall'infezione (Woodland & Randall 2004). Non e' chiaro se questi modelli complessi generati da esperimenti su animali siano applicabili alla situazione negli esseri umani. In ogni caso sara' essenziale capire meglio i tipi di risposta immunitaria e la generazione ed il mantenimento di una risposta effettiva delle cellule T della memoria durante l'infezione con influenza per poter migliorare future strategie di vaccinazione.

Conclusioni

Abbiamo visto come l'infezione con il virus dell'influenza porta allo sviluppo di malattia febrile respiratoria acuta. La patogenesi e' caratterizzata dalla replicazione e diffusione rapida del virus nei polmoni, e causa infiammazione locale e sistemica con rilascio di citochine. Questi eventi, insieme alla risposta immunitaria innata, aiutano a ridurre il carico virale, ad eliminare il virus ed ad iniziare la fase di recupero dalla malattia. Le risposte immunitarie cellulari ed umorali, provocate da

infezione o da vaccinazione, provvedono individui e popolazioni con immunita' protettiva e di lunga durata contro ceppi virali imparentati. L'influenza, tuttavia, puo' indebolire questa immunita' derivata da vaccino o da infezione attraverso antigenic shift e drift, e provocare epidemie e pandemie. Miglioramenti tecnici, che includono studi funzionali e genetici, aiuteranno ad ottenere una conoscenza piu' approfondita della patogenesi dei ceppi dei virus dell'influenza sia storici che attualmente in circolazione. Questa conoscenza, insieme ad una piu' avanzata comprensione dei meccanismi di difesa immunitaria contro il virus nei polmoni umani, potra' in futuro facilitare lo sviluppo di trattamenti farmacologici migliori e di vaccini piu' efficaci che potranno essere distribuiti globalmente contro varianti di influenza presenti e future.

Referenze

1. Abramson JS, Wheeler JG, Parce JW, et al. Suppression of endocytosis in neutrophils by influenza A virus in vitro. J Infect Dis 1986; 154: 456-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3734493

2. Achdout H, Arnon TI, Markel G, et al. Enhanced recognition of human NK receptors after influenza virus infection. J Immunol 2003; 171: 915-23. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12847262

3. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science 1996; 272: 54-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8600537

4. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004; 4: 499-511. http://amedeo.com/lit.php?id=15229469

5. Alford RH, Kasel JA, Gerone PJ, Knight V. Human influenza resulting from aerosol inhalation. Proc Soc Exp Biol Med 1966; 122: 800-4. http://amedeo.com/lit.php?id=5918954

6. Apisarnthanarak A, Kitphati R, Thongphubeth K, et al. Atypical avian influenza (H5N1). Emerg Infect Dis 2004; 10: 1321-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15324560

7. Baigent SJ, McCauley JW. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. Bioessays 2003; 25: 657-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12815721

8. Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. http://amedeo.com/lit.php?id=16192482

9. Belz GT, Smith CM, Kleinert L, et al. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 8670-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15163797

10. Bridges CB, Kuehnert MJ, Hall CB. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. Clin Infect Dis 2003; 37: 1094-101. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14523774

11. Brydon EW, Morris SJ, Sweet C. Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. FEMS Microbiol Rev 2005; 29: 837-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16102605

12. Buxton Bridges C, Katz JM, Seto WH. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. J Infect Dis 2000; 181: 344-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10608786

13. Cassidy LF, Lyles DS, Abramson JS. Synthesis of viral proteins in polymorphonuclear leukocytes infected with influenza A virus. J Clin Microbiol 1988; 26: 1267-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3045149

14. Chan MC, Cheung CY, Chui WH, et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. Respir Res 2005; 6: 135. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16283933

15. Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nat Med 2001; 7: 1306-12. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11726970

16. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? Lancet 2002; 360: 1831-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12480361

17. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. Emerg Infect Dis 2005; 11: 201-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15752436

18. Cox NJ, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses: Influenza. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed., Collier L, Balows A., Sussman M., eds., Edward Arnold, London Vol.1, 1997: 385-433.

19. Daniels RS, Douglas AR, Skehel JJ, et al. Antigenic analyses of influenza virus haemagglutinins with different receptor-binding specificities. Virology 1984; 138: 174-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=6208680

20. de Bree GJ, van Leeuwen EM, Out TA, Jansen HM, Jonkers RE, van Lier RA. Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung. J Exp Med 2005; 202: 1433-42. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16301748

21. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses. 2nd Edition, ASM Press, Washington, DC, USA, 2004

22. Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. Science 2004; 303: 1838-42. Epub 2004 Feb 5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14764886

23. Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. Virology 1998; 252: 324-30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9878611

24. Garcia-Sastre A. Antiviral response in pandemic influenza viruses. Emerg Infect Dis 2006 (in press).

25. Goto H, Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 10224-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9707628

26. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. J Biol Chem 2005; 280: 5571-80. Epub 2004 Dec 3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15579900

27. Hall WJ, Douglas RG Jr, Hyde RW, Roth FK, Cross AS, Speers DM. Pulmonary mechanics after uncomplicated influenza A infection. Am Rev Respir Dis 1976; 113: 141-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1247227

28. Hayden FG, Fritz R, Lobo MC, Alvord W, Strober W, Straus SE. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. J Clin Invest 1998; 101: 643-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9449698

29. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. Immunol Rev 2004; 199: 9-26. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15233723

30. Hemmes JH, Winkler KC, Kool SM. Virus survival as a seasonal factor in influenza and polimyelitis. Nature 1960; 188: 430-1. http://amedeo.com/lit.php?id=13713229

31. Horner GJ, Gray FD Jr. Effect of uncomplicated, presumptive influenza on the diffusing capacity of the lung. Am Rev Respir Dis 1973; 108: 866-9. http://amedeo.com/lit.php?id=4741881

32. Hulse DJ, Webster RG, Russell RJ, Perez DR. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. J Virol 2004; 78: 9954-64. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15331729

33. Ishikawa E, Nakazawa M, Yoshinari M, Minami M. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus infection in mice. J Virol 2005; 79: 7658-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15919918

34. Johansson BE, Bucher DJ, Kilbourne ED. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. J Virol 1989; 63: 1239-46. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2915381

35. Katz JM, Lim W, Bridges CB, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. J Infect Dis 1999; 180: 1763-70. http://amedeo.com/lit.php?id=10558929

36. Katze MG, DeCorato D, Krug RM. Cellular mRNA translation is blocked at both initiation and elongation after infection by influenza virus or adenovirus. J Virol 1986; 60: 1027-39. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3023655

37. Kondo S, Abe K. The effects of influenza virus infection on FEV1 in asthmatic children. The time-course study. Chest 1991; 100: 1235-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1935277

38. Lawrence CW, Braciale TJ. Activation, differentiation, and migration of naive virus-specific CD8+ T cells during pulmonary influenza virus infection. J Immunol 2004; 173: 1209-18. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15240712

39. Lawrence CW, Ream RM, Braciale TJ. Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8+ T cells during primary pulmonary influenza virus infection. J Immunol 2005; 174: 5332-40. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15843530

40. Legge KL, Braciale TJ. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. Immunity 2003; 18: 265-77. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12594953

41. Levandowski RA, Gerrity TR, Garrard CS. Modifications of lung clearance mechanisms by acute influenza A infection. J Lab Clin Med 1985; 106: 428-32. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=4045299

42. Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, et al. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. J Gen Virol 2005; 86: 1121-30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15784906

43. Little JW, Douglas RG Jr, Hall WJ, Roth FK. Attenuated influenza produced by experimental intranasal inoculation. J Med Virol 1979; 3: 177-88. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=479857

44. Little JW, Hall WJ, Douglas RG Jr, Mudholkar GS, Speers DM, Patel K. Airway hyperreactivity and peripheral airway dysfunction in influenza A infection. Am Rev Respir Dis 1978; 118: 295-303. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=358877

45. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature 2001; 409: 1055-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11234016

46. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. J Virol 2000; 74: 8502-12. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10954551

47. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 4620-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15070767

48. McCullers JA, Rehg JE. Lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. J Inf Dis 2002; 186: 341-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12134230

49. Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Nakakuki K, Sudo M, Kimura Y. In vivo induction of apoptosis by influenza virus. J Gen Virol 1995; 76: 2869-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7595397

50. Olofsson S, Kumlin U, Dimock K, Arnberg N. Avian influenza and sialic acid receptors: more than meets the eye? Lancet Infect Dis 2005; 5: 184-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15766653

51. Palladino G, Mozdzanowska K, Washko G, Gerhard W. Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice. J Virol 1995; 69: 2075-81. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7884853

52. Park CH, Ishinaka M, Takada A, The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. Arch Virol 2002; 147: 1425-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12111416

53. Peiris JS, Yu WC, Leung CW, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. Lancet 2004; 363: 617-9. http://amedeo.com/lit.php?id=14987888

54. Piqueras B, Connolly J, Freitas H, Palucka AK, Banchereau J. Upon viral exposure myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce three waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. Blood 2005; Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16317096

55. Renegar KB, Small PA Jr, Boykins LG, Wright PF. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. J Immunol 2004; 173: 1978-86. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15265932

56. Sanz-Ezquerro JJ, Zurcher T, de la Luna S, Ortin J, Nieto A. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. J Virol 1996; 70: 1905-11. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8627716

57. Schmitz N, Kurrer M, Bachmann MF, Kopf M. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. J Virol 2005; 79: 6441-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15858027

58. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol 2002; 2: 151-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11913066

59. Silver ML, Guo HC, Strominger JL, Wiley DC. Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide. Nature 1992; 360: 367-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1448154

60. Taubenberger JK. Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 9713-5. http://amedeo.com/lit.php?id=9707539

61. To KF, Chan PK, Chan KF, et al. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. J Med Virol 2001; 63: 242-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11170064

62. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N Engl J Med 2004; 350: 1179-88. http://amedeo.com/lit.php?id=14985470

63. Treanor JJ. Influenza virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Churchill Livingstone; 2004: 2060-2085.

64. Tsitoura DC, Kim S, Dabbagh K, Berry G, Lewis DB, Umetsu DT. Respiratory infection with influenza A virus interferes with the induction of tolerance to aeroallergens. J Immunol 2000; 165: 3484-91. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10975869

65. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science 2005; 310: 77-80. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16210530

66. Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, et al. Influenza A H5N1 replication sites in humans. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1036-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16022777

67. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). N Engl J Med 2005; 352: 333-40. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15668219

68. Utell MJ, Aquilina AT, Hall WJ, et al. Development of airway reactivity to nitrates in subjects with influenza. Am Rev Respir Dis 1980; 121: 233-41. http://amedeo.com/lit.php?id=7362132

69. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. Nature 1988; 333: 426-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3374584

70. Wiley JA, Cerwenka A, Harkema JR, Dutton RW, Harmsen AG. Production of interferon-gamma by influenza hemagglutinin-specific CD8 effector T cells influences the development of pulmonary immunopathology. Am J Pathol 2001a; 158: 119-30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11141485

71. Wiley JA, Hogan RJ, Woodland DL, Harmsen AG. Antigen-specific CD8(+) T cells persist in the upper respiratory tract following influenza virus infection. J Immunol 2001b; 167: 3293-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11544317

72. Wiley JA, Tighe MP, Harmsen AG. Upper respiratory tract resistance to influenza infection is not prevented by the absence of either nasal-associated lymphoid tissue or cervical lymph nodes. J Immunol 2005; 175: 3186-96. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16116209

73. Wilson NS, Behrens GMN, Lundie RJ, Systemic activation of dendritic cells by TLR ligands or malaria infection impairs cross cross-priming and anti-viral immunity. Nat Immunol 2006 (in press)

74. Woodland DL. Cell-mediated immunity to respiratory virus infections. Curr Opin Immunol 2003; 15: 430-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12900275

75. Woodland DL, Randall TD. Anatomical features of anti-viral immunity in the respiratory tract. Semin Immunol 2004; 16: 163-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15130500

76. Woodland DL, Scott I. T cell memory in the lung airways. Proc Am Thorac Soc 2005; 2: 126-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16113480

77. Yeldandi AV, Colby TV. Pathologic features of lung biopsy specimens from influenza pneumonia cases. Hum Pathol 1994; 25: 47-53. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8314260

78. Yen HL, Herlocher LM, Hoffmann E, et al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4075-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16189083

79. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71. http://amedeo.com/lit.php?id=9482437

80. Yuen KY, Wong SS. Human infection by avian influenza A H5N1. Hong Kong Med J 2005; 11: 189-99. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15951584

Chapter 5: Preparativi per una pandemia

Gustavo Reyes-Terán and René Gottschalk

Introduzione

Pandemie influenzali del passato

Sono note tre pandemie influenzali (epidemie a livello mondiale) del passato, tutte causate da virus A dell'influenza. Quando accadono cambi significativi, spontaneamente, in almeno una delle proteine di superfice dei virus A dell'influenza, emagglutinina e neuraminidase, nessuno possiede immunita' contro questo virus completamente rinnovato. Se il virus riesce anche ad ottenere la capacita' di essere trasmesso da persona a persona in maniera efficente, insieme all'abilta' di replicazione negli esseri umani associata a malattia grave, e' possibile che inizi una pandemia. Questo e' cio' che accadde nel 1918 (influenza "spagnola" causata da un sottotipo H1N1), nel 1957 (influenza "asiatica" causata da un sottotipo H2N2) e nel 1968 (influenza "Hong Kong" causata da un sottotipo H3N2). Stime conservative suggeriscono che la mortalita' associata alla pandemia del 1918 fu tra i 20 e i 40 milioni di persone. E' tuttavia possibile, se si considerano studi recenti dall'Africa e dall'Asia, che il numero di vittime mondiale possa essere stato di 50-100 milioni di persone (Johnson 2002).

Gli esperti nel campo dell'influenza hanno stimato che, se si considerano solamente le nazioni industrializzate, la prossima pandemia influenzale potrebbe risultare in fino a 130 milioni di visite di pazienti non ospitalizzati, 2 milioni di ospitalizzazioni e 650,000 decessi nel corso di due anni. E' probabile che l'impatto della pandemia sia anche maggiore in paesi in via di sviluppo (WHO 2004). E' previsto che una pandemia influenzale di tipo simile a quella del 1918 potrebbe causare dai 180 ai 360 milioni di decessi nel mondo (Osterholm 2005).

Minaccia pandemica da H5N1

Fin'ora (gennaio 2006), nove nazioni dell'estremo oriente hanno riportato epidemie nel pollame causate da un virus influenzale aviario altamente patogenico H5N1: la Repubblica Coreana, il Vietnam, il Giappone, la Tailandia, la Cambogia, il Laos, l'Indonesia, la Cina e la Malesia. Le epidemie in Giappone, Malesia e Repubblica Coreana sono state controllate con successo, ma

sembra che il virus sia diventato endemico in parecchie delle nazioni colpite. Le epidemie del sud est asiatico sono risultate nel decesso o nella mattanza di piu' di 150 milioni di uccelli e hanno provocato gravi conseguenze per l'agricoltura, in maniera speciale per i molti contadini che dipendono economicamente da allevamenti di uccelli da cortile.

Le epidemie recenti dovute allo stesso ceppo virale in uccelli in Russia, Kazakhastan, Turchia, Romania e Croazia evidenziano il fatto che il virus si e' diffuso oltre al focolaio iniziale (WHO 2005a, WHO 2005b).

Sono stati confermati casi di influenza aviaria A (H5N1) negli esseri umani, la maggioranza dei quali in seguto a contatto diretto con pollame malato o deceduto in aree rurali, in sei nazioni: Vietnam, Tailandia, Cambogia, Indonesia, Cina e Turchia (vedi Tavola 1). I numeri di casi in esseri umani di infezione con influenza aviaria A (H5N1) riportati al WHO vengono aggiornati regolarmente sulla pagina web del WHO (WHO 2005c).

Tavola 1. Numero totale di casi confermati in esseri umani di influenza aviaria A / (H5N1) riportati al WHO fino al 25 gennaio 2006 (WHO 2005c) *

	Casi**	Decessi
Vietnam	93	42
Tailandia	22	14
Cambogia	4	4
Indonesia	19	14
Cina	10	7
Turchia	4	2
Totale	152	83

* Il WHO riporta solamente casi confermati in laboratorio.
** Il numero totale dei casi include i decessi

Studi recenti suggeriscono che il virus del 1918 possa non essere stato un virus riassortito (come lo furono quelli delle pandemie del 1957 e del 1968), ma piu' probabilmente un virus di tipo aviario che si adatto' agli esseri umani. C'e' evidenza che l'elevata patogenicita' del virus del 1918 fosse dovuta alla sua emergenza come virus influenzale aviario adattato agli esseri umani (Taubenberger 2005). Un motivo di preoccupazione e' l'intrigante similarita' in un numero di cambi nelle proteine delle polimerasi del ceppo del 1918 con i ceppi di virus aviario in circolazione recentemente altamente patogenici H5N1 che hanno causato decessi negli esseri umani (Taubenberger 2005).

Avendo preso in considerazione il fatto che H5N1 e' nuovo dal punto di vista antigenico, che e' altamente patogenico negli esseri umani e che potrebbe acquisire la capacita' di essere trasmesso in modo efficente tra gli esseri umani, il WHO ha ribadito la sua chiamata del 1997 a tutte le nazioni perche' siano pronte per la prossima pandemia che ha definito "inevitabile e possibilmente imminente" (BWHO 2004), e ha aggiornato nell'aprile 2005 il suo piano per i prepartivi per la pandemia (WHO 2005d).

Preparativi per la pandemia influenzale

E' essenziale una pianificazione che permetta di ridurre o rallentare la trasmissione di un possibile ceppo influenzale pandemico e che diminuisca o almeno distanzi nel tempo il numero dei casi, di ospitalizzazioni e di decessi. Essere preparati aiutera' a mantenere attivi servizi essenziali ed a ridurre l'impatto economico e sociale della pandemia (WHO 2004).

Modelli epidemiologici indicano che una pandemia potrebbe causare il maggiore impatto sulle nazioni piu' povere, a causa delle limitazioni nella sorveglianza e nelle risorse per le cure mediche, cosi' come del livello generalmente basso di salute e di nutrizione della popolazione (WHO 2004).

Fasi della pandemia

Per definire la sequenza delle azioni da prendere durante certi eventi chiave, il Piano Globale di Preparazione all'Influenza del WHO (WHO 2005d) distingue fasi diverse. Ogni fase e' associata con azioni di salute pubblica nazionali ed internazionali. Le azioni nazionali che devono essere attivate durante ogni fase sono ulteriormente suddivise a seconda della situazione epidemiologica della nazione. Il WHO ha raccomandato vigorosamente che le nazioni prendano in considerazione le azioni nazionali proposte nel Piano Globale di Preparazione all'Influenza nello sviluppo o aggiornamento del loro piano nazionale. Un sommario di queste nuove fasi e' rappresentato nella Tavola 2. Al momento (gennaio 2006) il mondo e' in fase 3, dal momento che un nuovo sottotipo di virus influenzale sta causando malattia negli esseri umani, ma non e' ancora in grado di distribuirsi efficentemente e in modo continuato fra gli esseri umani.

Tavola 2. Fasi secondo il Piano Globale di Preparazione all'Influenza del WHO del 2005 (basato su WHO 2005d).

Periodo/ Fase	Evento
Periodo Interpandemico	
Fase 1	Nessun nuovo sottotipo di virus influenzale rivelato negli esseri umani. Un sottotipo di virus influenzale che ha causato infezione negli esseri umani puo' essere presente negli animali. Se presente negli animali il rischioa di infezione o malattia negli esseri umani e' considerato basso.
Fase 2	Nessun nuovo sottotipo di virus influenzale rivelato negli esseri umani. Tuttavia, un virus influenzale in circolazione negli animali presenta rischioa sostanziale di malattia negli esseri umani.
Periodo di allarme pandemico	
Fase 3	Infezione(i) umana con un nuovo sottotipo, ma nessun contagio fra esseri umani, o al massimo rari eventi di contagio fra persone con contatti ravvicinati.
Fase 4	Piccoli gruppi di contagio fra esseri umani, ma la distribuzione e' altamente localizzata, il che suggerisce che il virus non e' ben adattato agli esseri umanib.
Fase 5	Gruppi di dimensioni maggiori, ma contagio fra gli esseri umani ancora localizzato, il che suggerisce che il virus sta diventando sempre piu' ben adattato agli esseri umani, ma non e' ancora completamente contagioso (rischio di pandemia sostanziale)b.
Periodo pandemico	
Fase 6	Fase pandemica:contagio aumentato e sostenuto nella popolazione generaleb.
Periodo postpandemico	Ritorno al periodo interpandemico.

a. La distinzione fra *fase 1* e *fase 2* e' basata sul rischio di infezione umana o di malattia causata da ceppi circolanti negli animali. La distinzione dovrebbe essere basata su vari fattori e la loro importanza relativa in base alla conoscenza scientifica corrente. I fattori potrebbero includere: patogenicita' in animali e esseri umani; presenza negli animali domestici e negli allevamenti o solamente negli animali selvatici; il fatto che il virus sia enzootico o epizootico, geograficamente localizzato o ampiamente distribuito; altre informazioni derivate dal genoma virale; e/o altre informazioni scientifiche.

b. La distinzione fra *fase 3*, *fase 4* e *fase 5* si basa su una valutazione del rischio di una pandemia. Diversi fattori e la loro importanza relativa possono essere presi in considerazione in accordo con l'attuale conoscenza scientifica. I fattori possono includere: tasso di contagio; localizzazione e distribuzione geografica; gravita' della malattia; presenza di geni derivati da

ceppi di virus umani (se derivato da ceppi di virus animali); altre informazioni dal genoma virale e/o altre informazioni scientifiche.

Periodo interpandemico e periodo di allarme pandemico

Sorveglianza

La sorveglianza e' stata definite come la "raccolta, analisi, e interpretazione continua e sistematica di dati specifici, con referenza ad un esito specifico, per l'uso nella pianificazione, implementazione e valutazione di pratiche di salute pubblica", e non semplicemente una raccolta di dati (Flahault 1998). E' quindi fondamentale, per il controllo di malattie infettive prone all'epidemie, un sistema di sorveglianza tempestivo, rappresentativo ed efficente (PPHSN 2004).

Perche' le nazioni siano in grado di rivelare gruppi o numeri di casi unusuali di malattia che dipende da un nuovo virus dell'influenza, e' essenziale che abbiano un sistema che sia in grado di segnalare precocemente la malattia umana. Se una nazione partecipa alla Rete Globale di Sorveglianza dell'Influenza (Global Influenza Surveillance Network), essa contribuisce alla scoperta di virus influenzali con potenziale pandemico. Il tipo di sorveglianza e' diverso se il ceppo potenzialmente pandemico viene scoperto in animali domestici, in animali selvatici o negli esseri umani, e a seconda dell'area geografica in cui il uovo ceppo e' presente o in cui la sua circolazione e' considerata possibile (WHO 2005e).

La sorveglianza dovrebbe perlomeno condurre ad azioni. Prima di decidere sulle priorita' della sorveglianza le nazioni dovrebbero definire quali sono gli obiettivi della sorveglianza. La velocita' in cui i laboratori possono confermare i dati avra' un effetto sulla rapidita' nell'implementazione di misure di controllo. Il WHO raccomanda vigorosamente la separazione delle analisi di ceppi potenzialmente pandemici dalla normale diagnosi di routine dell'influenza.

I sistemi nazionali ed internazionali di riferimento devono tenere in considerazione le nuove Regolazioni Internazionali sulla Salute (IHR 2005).

Durante il periodo interpandemico e il perido di allarme pandemico (fasi 1-5) la sorveglianza in tutte le nazioni dovrebbe puntare all'identificazione rapida del ceppo circolante e alla scoperta e denuncia alla prima occasione del ceppo potenzialmente

pandemico in esseri umani ed animali. Nazioni colpite da una minaccia di pandemia dovrebbero anche determinare quanto diffusa sia l'epidemia, cosi come quanto sia presente o quanto efficente sia il contagio fra gli esseri umani. Le attivita' durante questo periodo dovrebbero includere: sorveglianza in laboratorio; un sistema di denuncia dei casi clinici inclusi quelli ospedalieri; un sistema di sorveglianza che possa identificare tempestivamente gruppi con malattia acuta del sistema respiratorio; un sistema basico di sorveglianza degli animali, e una collaborazione con un laboratorio di riferimento per l'identificazione di influenza non tipificabile. Le attivita' nelle nazioni che sono colpite da epidemie negli animali dovrebbero anche comprendere investigazioni sui singoli casi e la rintracciabilita' dei contatti, investigazioni dei gruppi e il monitoraggio di gruppi ad alto rischio. Attivita' di sorveglianza desiderabili durante la fase prepandemica possono includere la sorveglianza della polmonite e il monitoraggio della resistenza ai farmaci antivirali (WHO 2004).

E' cruciale che sia presente una sorveglianza basata su ospedali sentinella per un inizio tempestivo dell'implementazione delle misure di salute pubblica e delle investigazioni in laboratorio. Una rete nazionale di ospedali sentinella per la sorveglianza dovrebbero identificare individui con malattia respiratoria acuta fra i pazienti ospitalizzati, decessi fuori dal comune causati da malattia respiratoria acuta, o gruppi di malattia grave respiratoria acuta nella comunita'. Il personale sanitario degli ospedali sentinella dovrebbe ricevere una formazione specifica per la risposta durante una pandemia influenzale. E' necessario considerare la necessita' di educazione e formazione del personale sanitario, del personale di laboratorio, di volontari e di altre persone che potrebbero trovarsi a lavorare al di fuori della loro area di competenza e formazione.

Implementazione di servizi di laboratorio diagnostici

Come delineato dal WHO (WHO 2005e) e' necessario che i laboratori abbiano a disposizione capacita' diagnostiche di base in grado di confermare rapidamente infezioni umane sospettate di essere causate da un nuovo ceppo di virus influenzale. In nazioni con risorse limitate, bisognerebbe stabilire una rete di laboratori con perizie specifiche (ad esempio analisi diagnostiche dell'influenza). Nella fase interpandemica, tutte le nazioni dovrebbero avere accesso ad almeno un laboratorio in grado di offrire analisi diagnostiche comuni dell'influenza, di identificare tipi e sottotipi, ma non necessariamente di identificare il ceppo. Il WHO deve essere informato della presenza di questi laboratori. La

capacita' minima di questi laboratori dovrebbe includere immunofluorescenza (IF), e reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Nell'assenza di laboratori in grado di offrire diagnosi dell'influenza di routine, o l'identificazione di tipi e sottotipi, le nazioni possono usare kit per l'identificazione rapida degli antigeni. E' comunque necessario che i governi allochino o cerchino di procurare da altre nazioni le risorse necessarie a istituire laboratori in grado di eseguire sorveglianza epidemiologica.

In condizioni ottimali si dovrebbe avere a disposizione un inventario nazionale di laboratori con livelli di biosicurezza (BSL) 3 e 4. Normalmente, pero', paesi in via di sviluppo non hanno laboratori BSL-4 e hanno pochi o nessun laboratorio BSL-3. e' quindi consigliabile che i laboratori BSL-3 siano adattati a lavorare localmente (per ottenere una diagnosi veloce), o che organizzino collegamenti con laboratori BSL-3 e BSL-4 in altre nazioni con l'aiuto del WHO. All'inizio di una pandemia, sara' necessario aumentare il numero di analisi dal momento che non sara' possibile assumere che ogni caso di pazienti con sintomi simili all'influenza sia contagiato con il ceppo pandemico. Una volta che la pandemia e' stabilita, non sara' possibile analizzare tutti i casi. I laboratori dovrebbero essere in grado di provvedere i professionisti della sanita' con aggiornamenti e consigli in maniera regolare. Per le nazioni in cui il piano per i preparativi in caso di pandemia includono l'uso di farmaci antivirali, i laboratori dovranno essere preparati per monitorare la resistenza ai farmaci. E' necessario che i casi vengano denunciati giornalmente alle autorita' nazionali e al WHO insieme con le possibili fonti dell'infezione (WHO 2005e).

Vaccini

La terapia antivirale e la vaccinazione sono le uniche opzioni per il controllo di un'infezione da virus influenzale (Yen 2005, Korsman 2006). La vaccinazione rappresenta la migliore protezione contro l'influenza (van Dalen 2005), ma un vaccino adeguato non puo' essere sviluppato prima che il nuovo ceppo virale venga alla luce. Normalmente, ci vogliono almeno sei mesi per sviluppare un vaccino e produrlo su larga scala (Flemming 2005). Ma anche allora, la maggioranza dei paesi senza le industrie che producono vaccini non avranno accesso ai vaccini durante la prima ondata pandemica, a causa della limitata capacita' produttiva a livello globale e del fatto che le industrie che producono vaccino sono concentrate in paesi sviluppati.

Nazioni con industrie produttrici dovrebbero sostenere ed assicurare in tutti i modi che durante la pandemia sia possibile una produzione rapida e su larga scala. In certe nazioni sviluppate il governo pensa di avere la responsabilita' di provvedere la maggiore protezione possibile all'inizio di una pandemia. Per esempio, il governo olandese e' in discussione con un produttore di vaccino per assicurare che un vaccino contro un qualunque ceppo di influenza pandemica sara' disponibile in Olanda al piu' presto possibile in seguito al suo sviluppo (van Dalen 2005). Nel frattempo, nazioni senza industria produttrice di vaccino dovrebbero prepararsi con un programma di vaccinazione che possa essere condotto appena i vaccini contro la pandemia diventano disponibili (WHO 2005e).

La pianificazione per l'uso di un vaccino antipandemico dovrebbe comprendere: la designazione di cliniche per l'immunizzazione di massa, le strategie per l'impiego di personale e la sua formazione, le strategie per limitare la distribuzione a persone nei gruppi con priorita', l'abilita' di conservare il vaccino senza interrompere la catena del freddo, l'identificazone di luoghi di deposito di contingenza correnti e potenzialil, la sicurezza del vaccino durante il suo trasporto (prevenzione di furti), e la conservazione e uso nelle cliniche. Certi esempi di gruppi di priorita' sono, nel caso di influenza animale o aviaria, i macellai di animali o uccelli, i veterinari e gli allevatori; i dipendenti della sanita' e i dipendenti di servizi essenziali una volta che la pandemia e' imminente o stabilita (WHO 2005e).

Farmaci antivirali

I farmaci antivirali includono gli inibitori M2, che sono bloccanti dei canali ionici (amantidina e rimantidina), e gli inibitori della neuraminidase (oseltamivir e zanamivir) (Hoffmann 2006b). L'emergenza di varianti resistenti e' una proccupazione associata all'uso di un qualunque farmaco antivirale. Il trattamento con gli inibitori M2 puo' causare l'emergenza di varianti resistenti con piena patogenicita' e capacita' del contagio in almeno il 30% degli inidividui (Hayden 1997). Inoltre, gli inibitori M2 non mostrano effecacia contro H5N1 *in vitro* (Lipatov 2004).

Successivamente al trattamento con gli inibitori della neuraminidase, varianti resistenti vennero rivelate in circa il 4-8% dei bambini e in meno dell'1% degli adulti (McKimm-Breschkin 2003, Stilianakis 2002), e piu' tardi vennero identificati nel 18% di bambini giapponesi durante il trattamento con oseltamivir (Kiso 2004). L'emergenza di varianti dell'influenza A (H5N1) resistenti e'

stata riportata recentemente durante il trattamento con oseltamivir in due pazienti vietnamiti (de Jong 2005). In entrambi questi pazienti vennero isolati virus A dell'influenza (H5N1) con una sostituzione H274Y nel gene per la neuraminidase che conferisce un alto livello di resistenza all'oseltamivir (Gubareva 2001). Sebbene l'oseltamivir venne somministrato secondo le raccomandazioni per quanto riguarda dose e durata del trattamento (75 mg due volte al giorno per cinque giorni, con una riduzione della dose nei bambini in relazione al loro peso se di eta' minore ai 13 anni) e il trattamento venne iniziato nel momento di maggiore beneficio terapeutico (entro 48 ore dall'inizio dei sintomi), entrambi i pazienti morirono. Queste osservazioni suggeriscono che lo sviluppo di resistenza ai farmaci contribui' al fallimento della terapia in questi pazienti. Gli autori conclusero che le strategie mirate a migliorare l'efficacia antivirale (ad esempio l'uso di dosi maggiori, terapia estesa nel tempo, o terapia combinata) devono essere studiate in maggior dettaglio.

Bisognerebbe anche esplorare le possibilita' di somministrazione degli antivirali per vie alternative, dal momento che sono state riportate alterazioni nella farmacocinetica in pazienti gravemente malati con influenza che soffrono di diarrea (Hien 2004).

Esiste una certa preoccupazione che concerne l'abilita' di bambini e pazienti con difficolta' intellettuali o nella coordinazione ad inalare zanamivir in maniera adeguata. Tuttavia, dal momento che la resistenza contro l'oseltamivir puo' emergere durante il regime raccomandato al momento e che lo zanamivir potrebbe rivelarsi meno prono ad indurre lo sviluppo di mutazioni resistenti (Moscona 2005), e' possibile che lo zanamivir sia incluso nell'arsenale di farmaci antivirali contro le infezioni da influenza A (H5N1).

Scorte di farmaci

Alcuni governi hanno deciso recentemente di fare scorta di oseltamivir. Il numero di dosi di oseltamivir da tenere in scorta per ogni nazione dipende dalle risorse esistenti e dalla dimensione della popolazione. L'organizzazione mondiale per la sanita' sta incoraggiando le nazioni a fare scorta anticipata di farmaci (Abbott 2005). Per esempio, il governo olandese ha messo in scorta circa 225,000 dosi di oseltamivir (Groeneveld 2005). Molti paesi in via di sviluppo potrebbero pero' non essere in grado di permettersi le scorte di farmaci antivirali.

Il rapporto costi benefici delle scorte e la strategia migliore per l'uso di antivirali e' stata analizzata di recente per la popolazione di Israele usando dati (numero di episodi di malattia, visite

mediche, ospitalizzazioni e decessi) derivati da pandemie influenzali precedenti. Sono stati calcolati i costi per il sistema sanitario nazionale e i costi totali per l'economia, inclusi nell'ultima categoria i giorni lavorativi persi ma non il valore potenziale delle vite perdute (Balicer 2005). Sono state definite tre strategie per l'uso di oseltamivir durante una pandemia: uso terapeutico, profilassi pre-esposizione a lunga scadenza, e profilassi post-esposizione per i contatti ravvicinati con pazienti che soffrono di influenza (con pazienti all'indice in terapia) a breve scadenza. Le prime due strategie possono essere indirizzate o all'intera popolazione o solamente agli individui ad alto rischio di complicazioni. I costi delle scorte sono stati calcolati insieme al rapporto costi-benefici. Il rapporto costi-benefici piu' favorevole venne ottenuto quando i farmaci in scorta erano somministrati o come misura terapeutica o come profilassi a breve scadenza per i contatti esposti in una strategia chiamata "profilassi mirata" (Longini 2004). L'obbiettivo delle strategie mirate e' di minimizzare l'uso dei farmaci e allo stesso tempo massimizzarne gli effetti. Nei paesi in via di sviluppo e' quindi importante usare la profilassi mirata per risparmiare risorse.

Mentre non ci si aspetta l'uso di farmaci antivirali nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo, nelle nazioni sviluppate l'uso di agenti antivirali dipende dalla maggiore o minore disponibilita' dei farmaci (Tavola 3).

La creazione di scorte personali di oseltamivir e' fortemente scoraggiata (Brett 2005, Moscona 2005) dal momento che potrebbe facilmente portare all'uso di dosi insufficenti o a terapie inadeguate, e di conseguenza facillitare l'emergenza di varianti resistenti all'oseltamivir. Inoltre le scorte personali di oseltamivir renderebbero ancora piu' magra la disponibilita' di oseltamivir gia' scarsa per rispondere adeguatamente alla domanda.

Gli ospedali dovrebbero fare scorte di antibiotici per il trattamento di *Staphylococcus aureus* e di altre infezioni secondarie.

Tavola 3. Uso di agenti antivirali come raccomandato dal Ministero della Salute olandese (adattato da Groeneveld 2005)

1. Quando la pandemia arriva nei Paesi Bassi		
	Chi trattare Pazienti all'indice[a]	**A chi provvedere la profilassi** Famigliari, persone che coabitano o hanno altri contatti con i pazienti all'indice: profilassi post-esposizione
2. In una pandemia manifesta o nel caso di un'introduzione di virus dall'estero su larga scala		
Se gli inibitori della neuraminidase sono scarsi	**Chi trattare** Gruppi a rischio[b], professionisti[c], e (quando rilevante) persone in gruppi a rischio pandemia-specifici[a]; persone altrimenti sane: nel caso di ospitalizzazione dovuta a complicazioni	
Se gli inibitori della neuraminidasi sono disponibili	**Chi trattare** Pazienti che mostrano sintomi consistenti con quelli dell'influenza	**A chi provvedere la profilassi** Pazienti individuali[d] e gruppi a rischio, professionisti e (quando rilevante) persone in gruppi a rischio pandemia-specifici[e]

a. Appena possible dopo l'apparenza dei primi sintomi; se il trattamento nom viene iniziato entro 48 ore potrebbe rivelarsi non effettivo
b. Pazienti con gravi anormalita' o disfunzioni respiratorie, polmonari o cardiovascolari che, se infette con il virus pandemico influenzale, sarebbero a grave rischio di scompensi della funzione polmonare o cardioivascolare, pazienti con diabete insulino-dipendente
c. Tutte le persone responsabili per la diagnosi, trattamento e cura dei pazienti con influenza, o per la gestione logistica delle risorse necessarie.
d. Quando considerato necessario dal medico curante del paziente individuale.
e. In seguito a vaccinazione e mentre il virus e' ancora in circolazione.

Misure Generali

Misure di intervento non mediche si sono mostrate rilevanti per il controllo delle malattie infettive emergenti. In Tailandia, il programma nazionale contro l'influenza aviaria H5N1 considero' la **partecipazione comunitaria** a vari livelli. Dipendenti della sanita' pubblica, dipendenti della sanita' veterinaria, volontari della salute nei villaggi ed altri parteciparono in una campagna di sorveglianza nazionale che continua tutt'ora e che e' iniziata nell'ottobre 2004 che segue le istruzioni dalle autorita' nazionali (Barnett 2005). Il fatto che in Tailandia 17 pazienti furono contagiati con H5N1 dutante il 2004, mentre solo 5 vennero contagiati nel 2005 potrebbe essere il risultato di un successo iniziale di questo programma nazionale contro l'influenza aviaria

H5N1 (WHO 2005c). E' necessaria la coordinazione intrasettori che coinvolga settori non collegati con la sanita' (specialmente il settore dell'agricoltura, dell'economia, degli affari sociali e interni). E' consigliabile coinvolgere nella pianificazione reti professionali al di fuori del settore sanitario (ad esmpio legge, eucazione, turismo).

Un'effettiva **comunicazione dei rischi** precedente all'evento puo' ridurre il rischio di barriere nella comunicazione nella fase di presenza dell'evento (USDHHS 2005). La comunicazione dei rischi precedentemente all'evento a popolazioni a rischio e al pubblico in generale puo' avere enorme importanza per rilassare le tensioni sociali. Attraverso i mezzi di comunicazione di massa (TV, radio), il pubbico generale dovrebbe ottenere informazioni essenziali al riguardo delle misure rilevanti di igiene, di prevenzione, delle azioni non raccomandate, delle pratiche che comportano rischi e di altre questioni rilevanti. I mezzi di comunicazione di massa dovrebbero contribuire alla conoscenza generale della minaccia di pandemia influenzale per creare consapevolezza sociale.

Attivita' di formazione per i professionisti della sanita' dirette in maniera specifica alla preparazione in caso di pandemia sono utili per assicurare conformita' con l'uso di equipaggiamento protettivo e con le procedure di controllo dell'infezione**.**

Infine, esercizi di **simulazione della pandemia** sono utili per imparare cosa fare in caso una pandemia abbia luogo. Circa 1,000 dipendenti della sanita' e civili hanno partecipato ad un esercizio di emergenza nella capitale vietnamita Hanoi per provare la risposta ufficiale ad una pandemia di influenza aviaria. La prova, organizzata dalle autorita' cittadine, coinvolse abitanti locali, ospedali, unita' di sicurezza e dell'esercito del distretto di Hanoi Long Bien in cui l'evento ebbe luogo (Thanhnien 2005).

Vaccinazione antinfluenzale stagionale

Il vaccino antinfluenzale dovrebbe essere somministrato di norma ai gruppi a rischio per diminuire le possibilita' di doppio contagio con il ceppo circolante dell'influenza e il ceppo potenzialmente pandemico, che facilita il riassortimento. La vaccinazione con vaccino antinfluenzale inattivato e' raccomandata per le seguenti persone che sono a maggior rischio di complicazioni da influenza (ACIP 2005):

- Persone di eta' ≥ 65 anni;
- Residenti di case di cura e altre istituzioni per la cura di malati cronici che accomodano persone di qualsiasi eta' con condizioni mediche croniche;
- Adulti e bambini con disturbi cronici polmonari o cardiovascolari inclusa asma (l'ipertensione non e' considerate una condizione che comporta alto rischio);
- Adulti e bambini che richiesero visite mediche regolari o ospitalizzazoine durante l'anno precedente a causa di malattia cronica metabolica (compreso diabete mellito), disfunzioni renali, emoglobinopatie, o immunosoppressione (inclusa immunosoppressione causata da farmaci o dal virus dell'immunodeficenza umano [HIV]);
- Adulti e bambini che abbiano una qualunque condizione (ad esempio disfunzione cognitiva, danno alla spina dorsale, malattia convulsive, o altri disordini neuromuscolari) che possono compromettere le funzioni respiratorie o la gestione delle secrezioni respiratorie o che possono aumentare il rischio di aspirazione;
- Bambini ed adolescenti (di eta' compresa fra i 6 mesi e I 18 anni) che ricevono terapia con aspirina a lunga durata e che potrebbero di conseguenza sviluppare syndrome di Reye dopo infezione con influenza;
- Donne che potrebbero diventare gravide durante la stagione influenzale; e
- Bambini di eta' compresa fra i 6 e i 23 mesi.

Impegno politico

Uno dei fattori piu' significativi e' la disposizione politica e sociale ad ammettere e riportare la diffusione di malattie. Senza questo fattore chiave, non ci si puo' aspettare ulteriori azioni nazionali per la prevenzione delle pandemia. Il supporto e l'impegno politico ad alto livello sono necessari per sviluppare un piano di preparazione. Un'aumentata collaborazione regionale e una migliore creazione di reti di collaborazione, non solo possono portare al supporto vicendevole di coloro coinvolti nella pianificazione, ma possono anche essere usate come strumento per aumentare la pressione internazionale e di conseguenza l'impegno politico (WHO 2004). Testimonianze delle pandemie precedenti, specialmente quella del

1918, hanno dimostrato che un evento pandemico pio' avere conseguenze disastrose per qualunque nazione a causa del suo impatto sulle strutture socio-economiche e politiche (PPHSN 2004).

Questioni legali ed etiche

E' necessario che una legislatura appropriata sia presente prima che si presenti l'evento pandemico. In una situazione di disastro nazionale come quella che si verifica durante una pandemia, certe misure di salute pubbica richiedono il supporto del sistema giudiziario nazionale perche' siano implementate efficentemente. Per esempio, un atto di quarantina solitamente autorizza persone e servizi a prendere le misure necessarie per eradicare o controllare la disseminazione della malattia infettiva (PPHSN 2004). Misure simili di coercizione potrebbero essere necessarie se dovesse rivelarsi necessaria la vaccinazione per il contenimento della pandemia.

Finanziamento

Nazioni con risorse limitate dovrebbero formulare un piano ragionevolmente attuabile di preparazione nazionale alla pandemia influenzale, basato sulle risorse esistenti e sulla dimensione e struttura della popolazione. E' assolutamente necessario che ci sia supporto politico ad alto livello per la distribuzione dei finanziamenti designati per le situazioni di emergenza come la pandemia influenzale. Il processo di pianificazione dovrebbe includere l'identificazione di risorse possibili per il finanziamento della risposta alla pandemia.

Strategia globale per il controllo progressivo dell'influenza aviaria altamente patogenica

La possibile diffusione di influenza aviaria altamente patogenica (HPAI) a nuove regioni richiedera' l'intervento proattivo delle nazioni a rischio, specialmente quelle situate lungo le vie di migrazione degli uccelli selvatici. Saranno necessarie una maggiore sorveglianza, maggiori capacita' di identificazone e una maggiore preparazione all'emergenza. Sara' necessaria una consapevolezza del pubblico, insieme con l'educazione e la formazione di professionisti e para-professionisti della veterinaria, allevatori, commercianti, trasportatori di pollame e raccoglitori di uova per assicurare che la malattia sia o prevenuta o identificata e controllata in modo da prevenire che si stabilisca e si mantenga in nuovi ecosistemi (FAO 2005).

La FAO e la OIE, in collaborazione con il WHO, hanno preso l'iniziativa di incominciare il processo di sviluppo di una Strategia Globale di Controllo Progressivo e di Eradicazione del HPAI. Lo scopo della strategia e' quello di riuscire ad eliminare HPAI dal settore del pollame domestico in Asia e in Europa e a prevenire l'introduzione ulteriore di HPAI in nazioni non infette, in modo da minimizzare il rischio di una pandemia umana, promuovere una produzione di pollame profittevole, permettere un commercio robusto di pollame e di prodotti del pollame regionale ed internazionale, aumentare la sicurezza di cibo e cibarie, e migliorare il sostentamento di tutti coloro con interessi nel settore del pollame, specialmente i contadini poveri (FAO, OIE, WHO 2005).

Esistono numerose opportunita' per controllare l'influenza aviaria altamente patogenica:1) prevenzione del contatto fra pollame domestico e selvatico attraverso l'uso di pollai recintati e acque trattate; 2) prevenzione del contatto fra uccelli acquatici domestici e pollame gallinaceo attraversp l'uso di pollai recintati e acque trattate e tramite l'esclusione di uccelli acquatici da mercati che vendono animali vivi ("wet markets"); 3) eradicazione dei virus dell'influenza H5/H7 dal pollame gallinaceo tramite mattanza o usando vaccini per la prevenzione della malattia e della trasmissione; 4) prevenzione o minimizzazione del contatto tra pollame, maiali ed esseri umani e assicurazione della disponibilita' di vaccini e farmaci antivirali (Webster 2006).

Periodo pandemico

Durante un periodo pandemico l'obbiettivo principale dovrebbe essere il contenimento. E' stato osservato che un contenimento soddisfacente dipende dall'identificazione precoce del primo gruppo di casi causati dal ceppo pandemico (Ferguson 2004), e dall'identificazione di una grossa proporzione dei casi correnti (Ferguson 2005). Di conseguenza, per il successo del contenimento e' essenziale una sorveglianza ottimale.

Sorveglianza

La sorveglianza di una pandemia dovrebbe includere il monitoraggio di questi eventi: ammissioni in ospedale di casi sospetti o confermati di influenza causata dal ceppo pandemico, decessi fra i casi di influenza sospetti o confermati causati dal ceppo pandemico, assenteismo dei lavoratori in servizi considerati essenziali, uso del vaccino antinfluenzale di routine e specifico per il ceppo pandemico (se disponibili), eventi avversi attribuibili al

vaccino contro il ceppo pandemico (se disponibile), raccolta di dati per il calcolo, successivamente nel tempo, dell'efficacia del vaccino antipandemico, monitoraggio dell'uso del vaccino antipneumococcico e di eventi avversi che seguono al suo uso (se questo vaccino e' disponibile ed in uso), e monitoraggio dell'uso di farmaci antivirali e degli eventi avversi che potrebbero essere attribuiti al loro uso, se applicabile. In aggiunta deve essere assicurarto un meccanismo per l'aggregazione, interpretazione e trasmissione dei dati per poter prendere decisioni. La denuncia quotidiana di casi alle autorita' nazionali e al WHO, inclusa l'informazione sulla possibile origine dell'infezione deve essere eseguita (WHO 2005e).

Trattamento e ospitalizzazione

Durante il periodo in cui il numero di persone affette e' ancora limitato, i pazienti con influenza A (H5N1) sospetta o dimostrata dovrebbero essere ospitalizzati in isolamento per monitoraggio clinico, per la conduzione di analisi diagnostiche rilevanti e di terapia antivirale. Sia i pazienti che i loro familiari devono essere educati sull'igene personale e sulle misure da prendere per controllare l'infezione. La gestione si dovrebbe basare su un trattamento di supporto con l'approvvigionamento di ossigeno supplementare e supporto ventilatorio. I pazienti sospettati di avere influenza A (H5N1) dovrebbero ricevere tempestivamente un inibitore della neuraminidase in attesa dei risultati delle analisi diagnostiche di laboratorio (WCWHO 2005). Per ulteriori informazioni consultare Hoffmann 2006.

Risorse umane: personale della sanita'

Per il personale sanitario in contatto con i pazienti e' raccomandato l'uso di mascherine ad alta efficenza (con certificato NIOSH o N-95 o equivalente), camici a maniche lunghe con polsini, schermi protettivi per il viso o occhiali di protezione. Quando e' possibile bisognerebbe limitare il numero di personale sanitario in contatto diretto con i pazienti cosi' come l'accesso dei pazienti all'ambiente. Il personale sanitario coinvolto in procedure ad alto rischio (ad esempio procedure che generano areosol) dovrebbe essere preso in considerazione per la profilassi pre-esposizione (WCWHO 2005).

Profilassi mirata geograficamente e misure di distanza sociale

Sono a disposizione modelli per stimare la morbidita' e la mortalita' associate con l'influenza. Bisogna pero' ricordare che i modelli correntemente usati per le nazioni sviluppate non sono utili per i paesi in via di sviluppo.

Dopo avere applicato un modello di simulazione della trasmissione dell'influenza nel sud est asiatico, e' stato suggerito che l'eliminazione di una pandemia nascente potrebbe essere possibile usando una combinazione di profilassi mirata geograficamente e di misure di distanza sociale, questo se il numero di base di riproduzione del virus R_0 e' inferiore a 1.8 (Ferguson 2005). Il numero di base di riproduzione R_0 (Anderson 1992) quantifica la trasmissibilita' di un qualunque patogeno ed e' definito come il numero medio di casi secondari generato da un caso primario tipico in una popolazione interamente suscettibile. Una malattia puo' essere diffusa se $R_0>1$, ma se $R_0<1$ le catene di trasmissione si estingueranno in modo inevitabile. Di conseguenza, lo scopo finale delle politiche di controllo e' di ridurre R_0 a livelli inferiori a 1. Tuttavia, da questo modello di simulazione, Ferguson concluse che per ottenere un'alta probabilita' di successo e' necessario soddisfare un numero di criteri chiave: (1) rapida identificazione dei gruppi di casi originali, (2) identificazione dei casi rapida ed ad elevata sensibilita', e rapido inizio del trattamento di gruppi mirati, (3) effettiva distribuzione del trattamento alla stragrande proporzione della popolazione designata, (4) scorte sufficenti di farmaci, (5) cooperazione della popolazione con la strategia di contenimento e, in particolare, con le misure di distanza sociale introdotte, (6) cooperazione internazionale per lo sviluppo di politiche, di sorveglianza dell'epidemia e di implementazione della strategia di controllo. Un contenimento di successo e' poco probabile se R_0 e' maggiore di 1.8 per il ceppo pandemico.

E' stato suggerito, in un modello stocastico di simulazione dell'influenza che usa un approccio simile (Longini 2005), che la combinazione di profilassi antivirale mirata, prevaccinazione e quarantina potrebbero contenere ceppi con R_0 con valore fino a 2.4. Infatti, il WHO ha accettato entrambe le pubblicazioni sui modelli di risposta menzionati sopra (WHO 2005g). Esistono comunque argomentazioni critiche dei modelli di simulazione. Per esempio, e' stato notato che l'articolo di Longhini assume che l'oseltamivir sia utile in una pandemia, ma l'oseltamivir potrebbe non essere effettivo contro tutti i nuovi ceppi di virus influenzale aviario (Chung 2005). In aggiunta, l'oseltamivir si e' rivelato ineffettivo nel 50% dei pazienti in Tailandia (Fergusson 2005). E'

necessario avere un piano contingente per essere in grado di gestire i decorsi della malattia in continuo cambiamento ed essere preparati al peggio. Un modello che preveda la peggiore delle situazioni fornisce informazioni di valore per la pianificazione delle risorse, ad esempio il numero di respiratori, la quantita' di terapia intensiva e perfino il numero di pompe funebri che saranno necessarie (Chung 2005).

Misure di aumento della distanza sociale sono state usate in pandemie del passato e restano opzioni importanti nella risposta a pandemie future (WHO 2005f). Queste misure includono restrizioni di movimento e viaggi (ingresso e uscita dalle aree in cui l'infezione e' stabilita), chiusura di istituzioni educatrici, proibizione di assemblee, isolamento delle persone infette e di coloro che sono sospettati di essere infetti, e quarantina di individui esposti o di viaggiatori che provengono dalle aree in cui l'infezione con il ceppo pandemico dell'influenza e' stabilita (WHO 2005e). Bisogna ricordare pero' che l'efficacia di certe misure di distanza che furono implementate con successo per il contenimento della SARS devono ancora essere provate effettive nel caso dell'influenza. La ragione per questo e' che i pazienti con SARS non sono contagiosi prima dell'inizio della malattia, mentre i pazienti con influenza sono contagiosi prima di sviluppare sintomi evidenti (Ho 2004).

Rintracciamento dei casi sintomatici

E' previsto che sara' molto difficile controllare l'influenza usando il rintracciamento dei contatti a causa dell'alto livello di contagiosita' presintomatica. In aggiunta, e' probabile che non sia possibile rintracciare i contatti dell'influenza a causa della brevita' del periodo di incubazione (2 giorni) e del periodo contagioso (3-4 giorni) della malattia (Fraser 2004).

Controllo delle frontiere

Durante l'epidemia di SARS, la temperatura corporea dei passeggeri in transito su aereoplani venne misurata in molte occasioni. In questo modo, non venne permesso ad individui con febbre di viaggiare in aereo. Vicino ad ogni areoporto venne designato un ospedale per il ricovero, la diagnosi e il trattamento di ogni passeggero che presentasse febbre in aereoporto (Ho 2004). In ogni caso, con un apparecchio che misura la temperatura corporea usando infrarossi, possono essere identificati solo i pazienti con malattia influenzale sintomatica.

Igene e disinfezione

Le raccomandazioni per "l'igene respiratoria" come il coprirsi la bocca durante la tosse ed evitare spruzzi di sputo, sono state fatte piu' sulla base di efficacia plausibile che su studi controllati (CDC 2003). Il virus influenzale puo' rimanere vitale sulle superfici ambientali e si crede che possa essere trasmesso dalle mani e dai fomiti (WHO 2006). La maggior parte, ma non tutti, degli studi controllati mostrano un effetto protettivo del lavaggio delle mani nella riduzione delle infezioni dell'alto apparato respiratorio; e' probabile che la maggior parte delle infezioni in questi studi furono di origine virale, ma solo una piccola proporzione fu dovuta ad influenza (Fasley 1999). Non ci sono studi che si concentrano in maniera specifica sull'influenza (WHO 2006).

Comunicazione dei rischi

E' necessario stabilire una strategia della comunicazione dei rischi, abbastanza flessibile da aumentare in intensita' durante le diverse fasi della pandemia. Bisogna identificare i mezzi di comunicazione piu' adeguati ed efficacii che possono essere utilizzati. E' consigliabile identificare un portavoce ufficiale durante la fase interpandemica che possa continuare la comunicazione durante le susseguenti fasi della pandemia. Le sorgenti di informazioni devono essere credibili ed accettabili per il pubblico, ad esempio WHO, CDC, FAO. Il portavoce dovrebbe essere idealmente associato con le autorita'. Bisogna evitare la generazione di terrore e panico, mentre l'informazione pratica dovrebbe essere accessibile a tutti (PPHSN 2004).

Conclusioni

Una pandemia influenzale grave portera' a conseguenze devastanti, con rischi incalcolabili per la salute umana, l'economia globale e la stabilita' politica e sociale nella maggioranza delle nazioni. E' possibile che risorse finanziarie robuste e una buona infrastruttura medica possano aiutare ad alleggerire qualcuna di queste conseguenze; e' tuttavia probabile che paesi in via di sviluppo debbano affrontare la pandemia con scorte di farmaci antivirali insufficenti o non esistenti, e senza un vaccino adeguato.

Il rischio di pandemia nei paesi in via di sviluppo e' correlato ampiamente all'esposizione umana. In certe nazioni dell'Africa, del Sud America e del Sud Est Asiatico, pollame e persone dormono nello stesso ambiente. Nel sud est asiatico e oltre, i mercati che vendono pollame vivo presentano un rischio di contagio per gli esseri umani (Webster 2004). La riduzione dell'esposizione umana

richiede educazione su come gestire il pollame e un cambio fondamentale negli atteggiamenti culturali in gran parte del mondo che riguardano l'interazione fra esseri umani ed animali (World Report 2005). Semplici misure preventive nella preparazione del cibo, nel maneggiamento del pollame e di prevenzione del contatto con acque contaminate saranno essenziali fino a che non sara' disponibile un vaccino umano anti virus H5N1 (Hayden 2005). Di conseguenza i preparativi per affrontare una pandemia nei paesi in via di sviluppo dovrebbero prendere in considerazione finanziamenti per l'educazione pubblica che generino cambi culturali e miglioramenti dell'igene.

Il WHO ha indicato cinque strategie essenziali per la riduzione del rischio di pandemia:

- Ridurre l'esposizione umana
- Rafforzare la capacita' per il rapido contenimento (accumulo di un numero sufficente di cicli di trattamento di farmaci antivirali insieme a misure di distanza sociale)
- Rafforzare i sistemi di avvertenza precoci
- Analizzare rapidamente casi e gruppi di casi
- Garantire la capacita' generale del sistema sanitario.

Se la trasmissione di un nuovo ceppo pandemico iniziera' ad essere possibile tra gli esseri umani, la velocita' a cui l'influenza si diffondera' dipendera' su quanto precocemente questo fatto verra' identificato e dalla velocita' a cui la comunita' internazionale sara' in grado di mobilizzarsi e fornire assistenza, compresa la capacita' di provvedere farmaci antivirali per uso profilattico. Di conseguenza, in aggiunta al piano di preparazione nazionale, i governi dovrebbero cercare attivamente collaborazioni internazionali con nazioni vicine (Ho 2004). Il Direttore Generale del WHO Lee Jong-Wok ha avvisato le nazioni che " senza la cooperazione internazionale nessuna nazione si puo' considerare sicura".

In un incontro organizzato dal WHO a Ginevra nel novembre 2005 i rappresentanti di numerose nazioni povere hanno espresso preoccupazione riguardo alla mancanza di attivita' della promozione di una distribuzione equalitaria di scorte di farmaci e di vaccini nel caso di pandemia. Molte nazioni sono troppo povere per poter comprare scorte di farmaci e non hanno la capacita' per la produzione di vaccino o di versioni generiche dei farmaci (World

Report 2005). Le nazioni occidentali stanno accumulando farmaci antivirali e sviluppando vaccini lasciando le nazioni povere e con reddito medio nella preoccupazione che non saranno in grado di avere accesso a questi potenziali salvavita. Durante questo incontro, nessuna delle proposizioni indirizzo' in maniera diretta la questione dell'accesso equo a farmaci e vaccini in caso di pandemia (Enserink 2005).

Il supporto delle nazioni occidentali alle nazioni in via di sviluppo dovrebbe precedere la pandemia. Una volta che la pandemia inizia, sara' troppo tardi. Le pandemie non hanno frontiere, percio' la cooperazione internazionale e la distribuzione equa delle risorse dovrebbe iniziare il piu' presto possibile.

Referenze

1. ACIP 2005. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). July 13, 2005 / 54 (Early Release); 1-40. Available at: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr54e713a1.htm

2. Anderson RM, May RM. Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control. Oxford Univ. Press, Oxford, 1992.

3. Axbbott A. Avian flu special: What's in the medicine cabinet? *Nature* 435;407-409. Available from http://www.nature.com/nature/journal/v435/n7041/full/435407a.html

4. Balicer RD, Huerta M, Davidovitch N, Grotto I. Cost-benefit of stockpiling drugs for influenza pandemic. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1280-2. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no08/04-1156.htm

5. Barnett DJ, Balicer RD, Lucey DR, et al. A systematic analytic approach to pandemic influenza preparedness planning. PLoS Med 2005; 2: 1-7. Full text at http://medicine.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pmed.0020359

6. Brett AS, Zuger A. The run on tamiflu - should physicians prescribe on demand? N Engl J Med 2005; 353: 2636-37. Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2636

7. Brown H. Nations set out a global plan for influenza action. Lancet 2005; 366: 1684-5.

8. BWHO 2004. World is ill-prepared for "inevitable" flu pandemic. Bull World Health Organ 2004; 82:317-318.

9. CDC 2003. Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory hygiene/cough etiquette in healthcare settings 2003 Dec 17 [cited 2005 Nov 18]. Available at: http://www.cdc.gov/flu/professionals/infectioncontrol/resphygiene.htm

10. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. Emerg Infect Dis 2005; 11: 201-9. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol11no02/04-1061.htm

11. Chung PH. Preparing for the worst-case scenario. Science 2005; 310:1117-8.

12. CP/BSB 2003. Clinical Pharmacology/Biopharmaceutics Summary Background 2003. http://www.fda.gov/cder/foi/esum/2004/21246slr010,21087slr016_Tamiflu_Pharm_Biopharm _BPCA.pdf

13. de Jong MD, Thanh TT, Khank TH, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. N Engl J Med 2005; 353: 2667-72. Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2667

14. Enserink M. Meeting seeks global consensus, highlights global disparities. Science 2005; 310: 1103.

15. Fal Falsey AR, Criddle MM, Kolassa JE, McCann RM, Brower CA, Hall WJ. Evaluation of a handwashing intervention to reduce respiratory illness rates in senior day-care centers. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20: 200-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10100548

16. FAO 2005. FAO Avian influenza disease emergency. Update on the avian influenza situation (as of 12/11/2005) - Issue no. 36. Available at: http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/documents/ai/AVIbull036.pdf

17. FAO, OIE, WHO 2005. A Food and Agriculture Organisation (FAO), World Organisation for Animal Health (OIE) in collaboration with World Health Organisation (WHO) Global Strategy for the Progressive Control of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI). November 2005. Available at: http://www.fao.org/ag/againfo/resources/documents/empres/AI_globalstrategy.pdf

18. Ferguson NM, Cummings DA, Cauchemez S, et al. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. Nature 2005; 437: 209-14. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16079797

19. Ferguson NM, Fraser C, Donnelly CA, Ghani AC, Anderson RM. Public health risk from the avian H5N1 influenza epidemic. Science 2004; 304: 968-69.

20. Flahault A, Dias-Ferrao V, Chaberty P, Esteves K, Valleron AJ, Lavanchy D. Flu Net as a tool for global monitoring of influenza on the Web. JAMA 1998; 280: 1330-2. Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/full/280/15/1330

21. Fleming D. Influenza pandemics and avian flu. BMJ 2005;331:1066-9.

22. Fraser C, Riley S, Anderson RM, Ferguson NM. Factors that make an infectious disease outbreak controllable. PNAS 2004; 101: 6146-51. Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/101/16/6146

23. Groeneveld K, van der Noordaa J. Use of antiviral agents and other measures in an influenza pandemic. The Neth J Med 2005; 63: 339-43. Full text at http://www.zuidencomm.nl/njm/getpdf.php?id=437

24. Gubareva LV, Kaiser L, Matrosovich MN, Soo-Hoo Y, Hayden FG. Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. J Infect Dis 2001; 183: 523-31. Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v183n4/000943/000943.html

25. Hayden F, Croisier A. Transmission of Avian Influenza Viruses to and between Humans. The J Infec Dis 2005; 192: 1311-4.

26. Hayden FG. Antivirals for pandemic influenza. J Infect Dis 1997; 176: Suppl 1: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9240696

27. Hien TT, Nguyen TL, Nguyen TD, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N Engl J Med 2004; 350: 1179-88. Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/350/12/1179

28. Ho MS, Su IJ. Preparing to prevent severe acute respiratory syndrome and other respiratory infections. Lancet Infect Dis 2004; 4: 684-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15522680

29. Hoffmann C, Kamps BS. Drugs. In: Influenza Report 2006; Wuppertal 2006. Available from http://InfluenzaReport.com/ir/drugs.htm

30. Hoffmann C, Korsman S, Kamps BS. Treatment and Prophylaxis. In: Influenza Report 2006; Wuppertal 2006. Available from http://InfluenzaReport.com/ir/tp.htm

31. IHR 2005. International Health Regulations 2005. Available at: http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/WHA58_3-en.pdf

32. Imuta F, Toyoda M, Toyoda T. New application method of zanamivir with a straw. Pediatr Int 2003; 45: 366-7.

33. Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: Global mortality of the 1918-20 "Spanish" influenza pandemic. Bull Hist Med 2002; 76: 105-15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11875246

34. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet 2004; 364: 759-65. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15337401

35. Korsman S. Vaccines. In: Influenza Report 2006; Wuppertal 2006. Available from http://InfluenzaReport.com/ir/vaccines.htm

36. Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, et al. Influenza: emergence and control. J Virol 2004; 78: 8951-9. Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/17/8951?view=long&pmid=15308692

37. Longini IM Jr, Halloran ME, Nizam A, Yang Y. Containing pandemic influenza with antiviral agents. Am J Epidemiol 2004; 159: 623-33. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15033640

38. Longini IM Jr, Nizam A, Xu S, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, Cummings DA, Halloran ME. Containing pandemic influenza at the source. Science. 2005 Aug 12;309(5737):1083-7.

39. McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2264-72. Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/full/47/7/2264?view=long&pmid=12821478

40. Moscona A. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. N Engl J Med 2005; 353: 2633-6. http://amedeo.com/lit.php?id=16371626 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2633

41. Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. N Engl J Med 2005; 352: 1839-42. Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/18/1839

42. PPHSN 2004. Pacific Public Health Surveillance Network Guidelines for Influenza Preparedness & Control and Influenza Pandemic Preparedness (Part II). Prepared in Consultation with the PPHSN Influenza Specialist Group (ISG). Available at: http://www.spc.org.nc/phs/pphsn/Publications/Guidelines/Influenza/PPHSN_Influenza_pa ndemic-guidelines-partII-final_draft-oct04.pdf

43. Stilianakis NI, Perelson NS, Hayden FG. Drug resistance and influenza pandemics. Lancet 2002; 359: 1862-3.

44. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature 2005; 437: 889-93. Full text at http://www.nature.com/nature/journal/v437/n7060/pdf/nature04230.pdf

45. Thanhnien 2005. http://www.thanhniennews.com/healthy/?catid=8&newsid=10854

46. USDHHS 2005. United States Department of Health and Human Services 2005. Draft pandemic influenza preparedness and response plan. Annex 9: Communication and education. Available at: http://www.hhs.gov/nvpo/pandemicplan/annex9.communication.pdf

47. van Dalen PJ, Wijdenes C. Preparing for the next influenza pandemic. Neth J Med 2005; 63: 337-8. Full text at: http://www.zuidencomm.nl/njm/getpdf.php?id=436

48. Vardi A, Levin I, Berkenstadt H, et al. Simulation-based training of medical teams to manage chemical warfare casualties. Isr Med Assoc J 2002; 4: 540-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12120468

49. WCWHO 2005. The Writing Committee of the World Health Organisation (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/13/1374

50. Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. Emerg Infect Dis 2006; 12: 3-8. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1024.htm

51. Webster RG. Wet markets--a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? Lancet. 2004 Jan 17;363(9404):234-6.

52. WHO 2004: Informal consultation on influenza pandemic preparedness in countries with limited resources. Kuala Lumpur, Malaysia 23-25 June 2004. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2004_1/en/in dex.html

53. WHO 2005a: Geographical spread of H5N1 avian influenza in birds - update 28. Situation assessment and implications for human health. 18 August 2005. http://www.who.int/entity/csr/don/2005_08_18/en/index.html

54. WHO 2005b: Geographical Spread of H5N1 in Birds-update 34: 20 October 2005. http://www.who.int/csr/don/2005_08_18/en/index.html

55. WHO 2005c: Situation Updates: Accessed on January 25, 2006. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_01_25/en/in d ex.html

56. WHO 2005d: WHO global influenza preparedness plan: The role of WHO and recommendations for national measures before and during pandemics. Available at: http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_ 5/en/index.html

57. WHO 2005e: Checklist for influenza pandemic preparedness planning 2005. http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/FluCheck6web.pdf

58. WHO 2005f: Avian influenza: assessing the pandemic threat. http://www.who.int/csr/disease/influenza/WHO_CDS_2005_29/en/index.html.

59. WHO 2005G: WHO Statement. Available at: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2005/s08/en/index.html

60. WHO 2006. World Health Organisation Writing Group. Nonpharmaceutical interventions for pandemic influenza, international measures. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 81-7. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1370.htm

61. Yen HL, Herlocher LM, Hoffmann E, et al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4075-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16189083

Chapter 6: Vaccini

Stephen Korsman

Introduzione

I vaccini sono entita' apatogeniche che provocano una risposta da parte del sistema immunitario che, quando questo incontra il patogeno specifico rappresentato dal vaccino, gli permette di riconoscerlo – e di montare una risposta immunitaria protettiva, anche se l'organismo non ha mai incontrato quel patogeno particolare in precedenza.

I virus dell'influenza sono stati in contatto con gli esseri umani per almeno 300 anni, e hanno causato epidemie a distanza di pochi anni e pandemie a distanza di poche decine d'anni. Queste provocano 250,000 – 500,000 decessi e 3-5 milioni di casi di malattia grave ogni anno a livello mondiale, con il 5-15% della popolazione totale che contrae l'infezione (WHO 2003). Oggi siamo in grado di produrre annualmente 300 milioni di dosi di vaccino trivalente – abbastanza per le epidemie correnti nell'occidente, ma insufficienti per affrontare una pandemia (Fedson 2005).

Il vaccino antinfluenzale e' efficente nella prevenzione di malattie e decessi, specialmente nei gruppi ad alto rischio e, in un contesto di vaccinazione regolare, il WHO riporta che "il vaccino antinfluenzale e' la misura di prevenzione piu' efficiente a disposizione" (WHO 2005e). Al proposito della minaccia presente al momento di una pandemia, "La vaccinazione e l'uso di farmaci antivirali sono due delle piu' importanti misure di risposta per ridurre morbidita' e mortalita' durante una pandemia" (WHO 2005d).

Sviluppo dei vaccini

Storia

Il concetto della vaccinazione era praticato nell'antica Cina, dove pus derivato da pazienti con vaiolo veniva inoculato in persone sane per la prevenzione della contrazione di vaiolo naturalmente acquisito. Questo concetto venne introdotto in Europa all'inizio del IIXX secolo, e nel 1796, Edward Jenners fece il suo primo esperimento negli esseri umani usando vaiolo bovino per

vaccinare (vacca e' il termine latino per mucca) contro il vaiolo umano. Nel 1931 venne scoperta la crescita di virus in uova di gallina embrionate, e negli anni 40 l'esercito degli Stati Uniti sviluppo' i primi vaccini inattivati antiinfluenzali che vennero approvati ed usati durante la seconda guerra mondiale (Baker 2002, Hilleman 2000). Ulteriori avanzamenti in vaccinologia ed immunologia ebbero luogo e i vaccini diventarono sempre piu' sicuri per l'uso e prodotti in massa. Oggi, grazie agli avanzamenti in tecnologie molecolari, siamo sul punto di produrre vaccini antiinfluenzali che utilizzano la manipolazione genetica dei geni dell'influenza (Couch 1997, Hilleman 2002).

Produzione annuale di vaccini

Tutti i vaccini che sono in uso generale al momento sono derivati da virus cresciuti in uova di gallina e contengono 15 µg di antigene da ciascuno dei tre ceppi selezionati per il vaccino in un anno particolare – due ceppi di influenza A (H1N1 e H3N2) e uno di influenza B. Il processo per la selezione dei ceppi che devono essere usati nel vaccino, fino ad arrivare al vaccino finale e' lungo e puo' durare da 6 a 8 mesi.

Selezione annuale dei ceppi per il vaccino

Durante tutto l'anno, 110 centri di sorveglianza dell'influenza nazionali e 4 centri di collaborazione del WHO in 82 nazioni nel mondo, osservano le tendenze dei ceppi circolanti di influenza. Dati genetici vengono raccolti, e le mutazioni identificate. Il WHO identifica i ceppi che sono piu' probabilmente simili ai ceppi che saranno in circolazione durante la succesiva stagione invernale, e questa informazione viene messa a disposizione dei produttori di vaccino, che iniziano la preparazione per la produzione.

Questa decisione viene presa ogni anno in febbraio per l'inverno successivo nell'emisfero nord e in settembre per l'inverno successivo nell'emisfero sud. Dettagli per la riunione pianificata per il febbraio 2006 possono essere trovati sul website del WHO (WHO 2005k).

Per la stagione invernale dalla fine del 2004 all'inizio del 2005 nell'emisfero nord, le raccomandazioni furono le seguenti(WHO 2005h-i):

- un A/New Caledonia/20/99(H1N1)-like virus
- un A/Fujian/411/2002(H3N2)-like virus

- un B/Shanghai/361/2002-like virus

Per la stagione invernale della meta' del 2004 nell'emisfero sud, le raccomandazioni furono:

- un A/New Caledonia/20/99(H1N1)-like virus
- un A/Wellington/1/2004(H3N2)-like virus
- un B/Shanghai/361/2002-like virus

Per la stagione invernale 2005-2006 nell'emisfero nord le raccomandazioni furono:

- un A/New Caledonia/20/99(H1N1)-like virus
- un A/California/7/2004(H3N2)-like virus
- un B/Shanghai/361/2002-like virus

Per la stagione invernale della meta' del 2005 nell'emisfero sud le raccomandazioni furono:

- un A/New Caledonia/20/99(H1N1)-like virus
- un A/California/7/2004(H3N2)-like virus
- un B/Malaysia/2506/2004-like virus

Come esmpio, A/New Caledonia/20/99(H1N1) significa che il virus e' di influenza A, tipo H1N1, ed e' il ventesimo isolato dalla Nuova Caledonia nel 1999. e' possibile notare che l'influenza A H1N1 nel vaccino rappresenta ancora il ceppo circolante, mentre il virus H3N1 e' cambiato nel tempo. Ovviamente A/Fujian/411/2002 non rappresento' una buona previsione nel 2004. Di fatto, la frequenza di fallimento del vaccino fu particolarmente alta durante la stagione invernale 2004/2005.

Manifattura del vaccino

Subito dopo l'annuncio del WHO sul ceppo previsto in circolazione nella stagione successiva, i produttori di vaccino iniziano a produrre il nuovo vaccino per quel ceppo. Se il ceppo che viene scelto per essere rappresentato nel vaccino e' lo stesso ustato nel vaccino precedente il processo e' piu' veloce.

In primo luogo, il CDC (Center for Disease Control negli Stati Uniti), o un'altra origine di referenza, prende i ceppi che devono essere usati per il vaccino e li cresce in combinazione con un ceppo chiamato PR8 (H1N1 A/PR/8/34) che e' attenuato in modo

da essere apatogenico e incapace di replicazione negli esseri umani (Beare 1975, Neumann 2005). Questo permette un riassortimento che risulta in un virus che contiene sei geni PR8 in combinazione con l'emagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA) del ceppo stagionale. Il nuovo virus viene quindi incubato in uova embrionate di gallina per 2-3 giorni, dopo di che il fluido allantoico viene raccolto, e le particelle di virus vengono centrifugate in una soluzione a densita' gradualmente aumentata, il che risulta in concentrazione e purificazione del virus ad una determinata densita'. Successivamente i virus vengono inattivati usando formaldeide o β-propriolattone, distrutti con detergente e le HA e NA vengono purificate. Infiine, le concentrazioni vengono standardizzate in base alla quantita' di emagglutinina presente (Hilleman 2002, Potter 2004, Treanor 2004).

Verso giugno/luglio, i ceppi vengono esaminati per assicurare un'adeguata resa, purezza e potenza. Successivamente i tre ceppi – due ceppi di influenza A e uno di influenza B, tutti prodotti separatamente – vengono combinati in un vaccino, il loro contenuto viene verificato, e confezionato in siringhe per la distribuzione.

Produttivita'

Al momento, il mondo ha una produttivita' annuale pari a circa 300 milioni di vaccini antinfluenzali, la maggior parte dei quali viene prodotta in nove nazioni – Australia, Canada, Francia, Germania, Italia, Giappone, Paesi Bassi, Regno Unito, e Stati Uniti. Nel 2003, solo 79 milioni di dosi vennero utilizzate al di fuori di queste nazioni e dell'Europa occidentale. Un ulteriore 13.8 milioni di vaccini vennero prodotti ed utilizzati in Ungheria, Romania e Russia (Fedson 2005).

Approssimativamente 4-5 milioni di dosi di vaccino con virus vivo attenuato vengono prodotte annualmente

Tipi di vaccino antinfluenzale

I diversi tipi di vaccino in uso oggi per combattere l'influenza possono essere divisi in vaccini con virus inattivato (ucciso) e vaccini con virus vivo. Vaccini di tipo diverso sono in via di sviluppo, cosi' come vaccini che non rientrano in nessuna delle due categorie in cui e' coinvolto un certo grado di manipolazione genetica.

Vaccini inattivati (uccisi)

I vaccini con virus inattivato possono essere divisi in vaccini con virus intero e vaccini separati (split virus) o a subunita'.

I vaccini con virus intero furono i primi ad essere sviluppati. Il virus dell'influenza, cresciuto nel sacco allantoico di uova di gallina embrionate, venive successivamente purificato e concentrato usando eritrociti e, infine, inattivato usando formaldeide o β-propiolattone. Ultimamente, questo metodo di purificazione e concentrazione venne sostituito con purificazione in centrifuga e, successivamente, con centrifugazione in gradiente di densita' in cui particelle virali di una particolare densita' precipitano ad un certo livello in una soluzione di densita' crescente. Successivamente venne aggiunta ai metodi a disposizione per la purificazione/concentrazione la purificazione attraverso filtri a membrana (Hilleman 2002, Potter 2004).

I vaccini con virus intero sono sicuri da usare e ben tollerati ed hanno un efficacia del 60-90% in adulti e bambini.

Vaccini split virus vengono prodotti nello stesso modo dei vaccini con virus intero, ma le particelle virali vengono distrutte usando detergenti o, in passato, etere.

I vaccini a subunita' consistono di proteine HA e NA purificate dopo la rimozione delle altre componenti virali. I vaccini separati o composti di subunita' causano minori reazioni locali in confronto ai vaccini interi, e una singola dose produce livelli di anticorpi adeguati in una popolazione esposta a virus simili (Couch 1997, Hilleman 2002, Potter 2004). Tuttavia, questo potrebbe rivelarsi non sufficiente se un nuovo virus influenzale pandemico dovesse emergere e se si pensa che sara' necessario somministrare due dosi.

Vaccini antiinfluenzali inattivati sono generalmente somministrati per via intramuscolare, sebbene al momento sono sotto investigazione vie di somministrazione intradermale (Belshe 2004, Cooper 2004, Kenney 2004) ed intranasale (mucosale) (Langley 2005).

Vaccini vivi

Vaccini CAIV (cold-adapted live attenuated influenza vaccine), per somministrazione intranasale, sono disponibili negli Stati Uniti dal luglio 2003, e nell'ex Unione Sovietica, vaccini antinfluenzali vivi attenuati sono in uso da parecchi anni. Il vaccino consiste di un virus master attenuato in cui vengono inseriti i geni HA e NA. I virus master usati sono A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) e B/Ann

Arbor/1/66 (Hoffman 2005, Palese 1997, Potter 2004). Il vaccino con virus master e' adattato a basse temperature (cold-adapted) – in altre parole, e' adattato ad una crescita ideale a 25 gradi Celsius, il che significa che alla normale temperatura corporea e' attenuato. E' stato dimostrato che il processo di adattamento ha prodotto mutazioni stabili nei tre geni virali per le polimerasi PA, PB1 e PB2 (Hilleman 2002, Potter 2004).

I vantaggi di un vaccino con virus vivo applicato alla mucosa nasale stanno nello sviluppo di immunita' locale neutralizzante, nello sviluppo di risposta immunitaria cellulo-mediata, e in una risposta immunitaria a reattivita' incrociata e di lunga durata (Couch 1997).

Nel vaccino CAIV sono stati espresse riserve nell'uso in pazienti immunocompromessi (sicurezza?) e nella possibile interferenza fra ceppi virali presenti nel vaccino che potrebbero risultare in un' efficacia inferiore. Danni alle superfici mucosali, sebbene di gran lunga inferiori a quelli causati da virus influenzali virulenti wild-type, potrebbero portare a suscettibilita' ad infezioni secondarie. Le riserve sulla sicurezza tuttavia non sembrano essere un problema negli individui immunocompetenti. Di piu' grande preoccupazione nel futuro e' la possibilita' di riversibilita' genetica – in cui le mutazioni responsabili per l'attenuamento ritornano al loro stato wild-type – e di riassortimento con virus influenzali wild-type, che possono generare un nuovo ceppo. Studi condotti per verificare queste possibilita', tuttavia, non hanno rivelato fin'ora problemi di questo tipo (Youngner 1994).

Vaccini e tecnologie in fase di sviluppo

Si spera che **colture cellulari**, che usano cellule canine di rene Madin-Darby (MDCK) o cellule Vero (African green monkey kidney) approvate per la produzione di vaccino umano, possano eventualmente rimpiazzare l'uso di uova di gallina, e risultare in una maggiore produttivita', e in un processo di coltura meno impegnativo. Tuttavia, l'installazione di tali laboratori richiede sia tempo che denaro e la maggior parte dei produttori di vaccini sta iniziando solamente ora questo processo.

La **Reverse genetics** permette la manipolazione in maniera specifica del genoma dell'influenza, e lo scambio di segmenti di genoma per altri a richiesta (Palase 1997, Palese 2002b). Usando questo metodo, sono stati sviluppati numerosi metodi basati su plasmidi (Neumann 2005) per la costruzione di nuovi virus per vaccini, che pero' non sono ancora a disposizione commercialmente. Un numero di plasmidi, piccoli DNA circolari,

che contengono i geni e le regioni promotrici del virus dell'influenza, vengono trasfettati all'interno di cellule che sono capaci di produrre i segmenti genomici virali e le proteine virali per formare nuove particelle virali. Se questo metodo potesse essere utilizzato su larga scala, potrebbe semplificare e rendere piu' veloce lo sviluppo di nuovi vaccini – al posto del difficile compito, per i vaccini vivi attenuati, di permettere il riassortimento nelle uova, e successivamente andare alla ricerca del riassortimento corretto (6 geni dal ceppo master del vaccino, e HA ed NA dal ceppo selezionato per il nuovo vaccino), i produttori di vaccino potrebbero semplilcemente inserire i geni HA ed NA in un plasmide.

Vaccini a DNA sono stati sperimentati per una varieta' di patogeni virali e batterici. Il principio su cui si basa il vaccino e' l'inoculazione del virus con DNA, che e' raccolto da cellule presentatrici di antigene, permettendo loro di produrre proteine virali nel loro citosol. Queste vengono intercettate dal sistema immunitario e stimolano una risposta immunitaria sia umorale che cellulare (Hilleman 2002).

Vaccini contro proteine conservate sono stati presi in considerazione, e fra i candidati sono le proteine M2 e NP. Si spera che, producendo immunita' contro proteine conservate, ad esempio proteine che non presentano cambi antigenici come invece fanno HA e NA, si potrebbe produrre un vaccino che non debba essere "reinventato" ogni anno. Questa idea e' anche presente nell'agenda del WHO per la costruzione di un vaccino antipandemico (Couch 2005). Tali vaccini hanno mostrato di essere efficaci in animali da laboratorio, ma non ci sono dati a disposizione su studi umani. SI stanno considerando anche vaccini "generici" basati su HA, mirati alle aree conservate della proteina (Palese 2002b).

Adiuvanti sono stati utilizzati in numerosi vaccini contro altri patogeni, e sono al momento sotto investigazione per il loro ruolo nei vaccini antinfluenzali. Lo scopo degli adiuvanti e' di aumentare la risposta immunitaria al vaccino che permette una dose inferiore di antigene o una maggiore efficacia, o entrambe le cose. Alum e' l'unico adiuvante registrato negli Stati Uniti, e MF59, un'emulsione di olio e acqua, e' stato usato nei vaccini antinfluenzali in Europa sin dal 1997 (Wadman 2005). Un vaccino che usa le proteine di membrana esposte all'esterno di *Neisseria meningitidis* come adiuvante ha mostrato successo in prove cliniche preliminari (Langley 2005).

Attenuazione tramite delezione del gene NS1 o diminuzione dell'attivita' di NS1 e' sotto investigazione. NS1 produce una

proteina che inibisce le funzioni dell'interferone alfa (IFNα). Se un virus influenzale wild-type infetta una persona, la proteina NS1 antagonizza IFNα, che ha effetto antivirale. Un'infezione con virus deficiente per NS1 verrebbe velocemente abbattuta dal sistema immunitario, e si puo' sperare che risulti in una risposta immunitaria, ma senza sintomi (Palese 2002b).

Virus influenzali difettivi nella replicazione possono essere generati tramite delezione del gene M2 o del gene NS2 (Hilleman 2002, Palese 2002b). In questo caso si puo' verificare solo un ciclo di replicazione, con terminazione prima della formazione di particelle virali infettive. L'espressione proteica risulta in una risposta immunitaria e non c'e' pericolo di diffusione dell'infezione ad altre cellule o persone.

Efficacia ed efficienza

La risposta anticorpale, determinata misurando i titoli di inibizione dell'emagglutinazione, e' usata come marker sierologico della risposta immunologica al vaccino, o efficacia. In persone che sono state esposte a virus dello stesso sottotipo in precedenza, la risposta anticorpale e' simile per i vari tipi di vaccino. Tuttavia, in persone che non hanno avuto questo tipo di esposizione in precedenza (ne' tramite vaccinazione, ne' tramite infezione naturale), la risposta e' inferiore con vaccini split e con vaccini a subunita', pe i quali sono richieste due dosi.

In adulti sani esposti, l'efficacia dopo una dose varia dall'80 al 100%, mentre in adulti non esposti l'efficacia raggiunge queste variazioni dopo due dosi. In altre popolazioni l'efficacia e' minore:

Tavola 1: Efficacia della vaccinazione antinfluenzale *

Popolazione	Efficacia
Adulti sani e maggior parte dei bambini	80-100%
Insufficenza renale (cronica)	66 %
Trapianto renale	18-93%
Emodialisi	25-100%
Trapianto di midollo osseo	24-71%
Cancro	18-60%
Infezione con HIV	15-80%

*adattato da Pirofzki 1998, Potter 2004, Musana 2004

L'efficienza, usualmente definita come prevenzione della malattia, e' generalmente leggernente piu' bassa, con una variazione tra il 70 e il 90% in bambini e adulti sani di eta' inferiore ai 65 anni. In adulti di eta' superiore ai 65 anni, viene riscontrato il tasso inferiore di 30-40%. Tuttavia, il vaccino e' effettivo per il 20-80% nel prevenire i decessi da influenza in persone di eta' superiore ai 65 anni, con il rischio di mortalita' ridotto ogni anno con la rivaccinazione piu' che con vaccinazione singola (Govaert 1994, Gross 1995, Nichol 1994, Partriarca 1985, Voordouw 2004). Uno studio in pazienti con precedente infarto miocardico (MI) ha dimostrato una riduzione del rischio di decesso nell'anno (6% nel gruppo vaccinato, 13% nel gruppo di controllo) cosi' come nella combinazione di decesso, MI ripetuta, o riospitalizzazione (22% contro 37%) possibilmente a causa di un effetto non stpecifico di responsivita' immunitaria. Sono pianificati studi ulteriori per valutare l'impatto della vaccinazione antinfluenzale in sindromi coronariche acute.

La vaccinazione antinfluenzale del personale sanitario e di coloro che si occupano dei malati ha anche l'effetto di ridurre l'esposizione all'influenza di popolazioni vulnerabili.

Sono stati eseguiti studi sull'efficienza in termine di costi e benefici per la salute in numerose popolazioni di persone sane (Bridges 2000, Langley 2004, Monto 2000, Wilde 1999). Questi suggeriscono che, mentre la salute individuale trae beneficio dalla vaccinazione, cosi' come si riducono i giorni di assenza dal posto di lavoro, la vaccinazione di adulti sani impiegati non fornisce necessariamente un risparmio nei costi in confronto a perdita di produttivita' e giorni lavorativi persi a causa di malattia. E' raccomandata la vaccinazione del personale sanitario, non solo per il beneficio per la salute e la riduzione di giorni di assenza dal posto di lavoro, ma perche' si crede che gli impiegati ospedalieri hanno la tendenza a presentarsi al lavoro anche quando sono vittime di malattia febbrile acuta. Studi eseguiti in precedenza hanno mostrato che la vaccinazione del personale sanitario riduce le infezioni influenzali acquisite in case di riposo ed in ospedale (Pachuki 1989, Potter 1997).

Effetti collaterali

La sindrome Guillain-Barre' e' considerata come l'effetto collaterale piu' pericoloso dei vaccini influenzali, oltre alle manifestazioni di allergie alle componenti dell'uovo. E', tuttavia, rara: il tasso riportato annualmente e' diminuito da un alto 0.17 in 100,000 vaccini nel 1993-1994 a 0.04 nel 2003-2004 (Haber 2005).

Gli effetti collaterali piu' frequenti sono dolore, rossore, e gonfiore nel sito di iniezione (10-64%) che durano 1-2 giorni, ed effetti collaterali sistemici come mal di testa, febbre, malore e mialgia in circa il 5% dei vaccinati (Belshe 2005, Musana 2004, Potter 2004). Questi effetti collaterali sono dovuti maggiormente ad una risposta immunitaria locale, con produzione di interferone che porta a effetti sistemici. Effetti collaterali locali sono piu' comuni con vaccini da virus intero che a subunita' o split, ed ancora piu' comuni con vaccinazione intradermale che con vaccinazione intramuscolare.

Dal momento che i vaccini inattivati non contengono virus vivente, essi non possono causare infezione influenzale – spesso malattia respiratoria viene attribuita incorrettamente a vaccinazione antinfluenzale. I vaccini con virus vivo attenuato contengono virus vivo; tuttavia, gli effetti collaterali sono rari, con naso che cola, congestione, mal di gola e mal di testa come i sintomi piu' spesso riportati, occasionalmente e' possibile che si presenti dolore addominale, vomito e mialgia (Musana 2004). Questi vaccini non sono raccomandati per l'uso in bambini di eta' inferiore ai 5 anni, sebbene uno studio eseguito da Piedra et al. (Piedra 2005) ha mostrato che il vaccino e' sicuro in bambini di eta' superiore ai 18 mesi. Sono state sollevate controversie sulla possibilita' di asma esacerbata in bambini di eta' fra i 18 e i 34 mesi (Bergen 2004, Black 2004, Glezen 2004). Bisogna tuttavia notare che l'uso di questi vaccini dovrebbe essere evitato in pazienti immunocompromessi.

Raccomandazioni per l'uso

Indicazioni

Grouppi bersaglio

I gruppi piu' importanti da prender in considerazione per la vaccinazione possono essere memorizzati facilmente con una sigla facile da ricordare – FLU-A (Musana 2004).

F - facilities. Luoghi di cura come case di riposo, o luoghi di cura per malattie croniche.

L – likelihood. Facilita' di trasmissione a persone ad alto rischio – personale ospedaliero e persone che si curano di malati possono trasmettere l'influenza a pazienti, cosi' come possono farlo altri impiegati che servono gruppi di popolazioni ad alto rischio, e persone che vivono con individui ad alto rischio.

U – underlying. Malattie subordinate come diabete mellito, malattia cronica cardiaca o polmonare, gravidanza, cancro, immunodeficenza, malattia renale, recipiente di trapianto di organi, ed altre.

A- age. Eta' maggiore di 65 anni o fra 6 e 23 mesi.

Dal momento che il rischio di influenza aumenta in modo lineare dall'eta' di 50 anni, viene in certi casi promossa la vaccinazione di persone di eta' fra i 50 e i 64 ann in aggiunta a coloro di eta' superiore ai 65 anni. In uno studio sull'atteggiamento del personale sanitario verso tale politica in Inghilterra, le persone a favore o contrarie si mostrarono divise in parti uguali (Joseph 2005). La vaccinazione di persone di eta' superiore ai 50 anni e' raccomandata negli USA, mentre viene offerta la vaccinazione a tutti coloro di eta' superiore ai 6 mesi in Canada.

Nell'era di una potenziale pandemia alle porte, anche altri gruppi hanno importanza nel decidere quali sono le popolazioni a cui mirare – lavoratori nell'industria del pollame nell'estremo oriente sono vaccinati per prevenire l'infezione con i ceppi circolanti di influenza umana. Questo vaccino non proteggera' contro il virus aviario influenzale, ma aiutera' a prevenire l'infezione doppia, se infezione con influenza aviaria accade, e di conseguenza a ridurre l'opportunita' di riassortimento di due ceppi in un ospite umano. Per lo stesso motivo, a turisti e persone che viaggiano in aree in cui l'influenza aviaria e' presente viene consigliata la vaccinazione antinfluenzale umana (Beigel 2005).

Raccomandazioni

L'organizzazione Mondiale per la Sanita' (WHO) fa le seguenti raccomandazioni su chi dovrebbe ricevere il vaccino antinfluenzale:

- Residenti di istituzioni per anziani e disabili.
- Individui anziani non istituzionalizzati con malattia cronica cardiaca o polmonare, malattia renale o metabolica, o immunodeficenze.
- Tutti gli individui di eta' superiore ai 6 mesi con una delle malattie di cui sopra.
- Individui anziani al di sopra dell'eta' definita nazionalmente come eta' limite, al di la' di altri fattori di rischio.

Altri gruppi sono definiti sulla base di dati nazionali e competenze come persone a contatto con persone ad alto rischio, donne in

gravidanza, personale sanitario ed altri con funzioni chiave nella societa', cosi' come bambini di eta' compresa fra i 6 e i 23 mesi.

Le raccomandazioni del CDC sono simil, con qualche aggiunta (Harper 2004, CDC 2005) -

- Residenti di case di cura e istituzioni di cura a lungo termine.
- Persone di eta' 2-64 anni con malattia cronicaqa.
- Tutti i bambini di eta' compresa fra i 6 e i 23 mesi.
- Adulti di eta' >65 anni – alto rischio.
- Adulti di eta' > 50 anni – raccomandato.
- Tutte le donne che sono in gravidanza durante la stagione influenzale.
- Bambini di eta' fra i 6 mesi e i 18 anni che sono in terapia cronica con aspirina.
- Personale sanitario coinvolto direttamente nella cura di pazienti.
- Persone che si curano di bambini di eta' compresa fra 0 e 23 mesi e i loro contatti domestici.

Il Sud Africa presenta le seguenti raccomandazioni (riassunte da Schoub 2005), che dividono la popolazione in 4 gruppi che possono ricevere il vaccino –

- Categoria 1 – Pesone a rischio (cioe' a rischio di complicazioni causate da influenza)
    - Tutte le persone di eta' superiore ai 65 anni
    - Persone con malattia cardiaca o polmonare cronica
    - Persone immunosoppresse
    - Gravidanza – donne che saranno nel secondo o terzo semestre durante la stagione invernale. La vaccinazione e' controindicata nel primo trimestre.
    - Bambini con malattia cronica cardiaca o polmonare cosi' come bambini immunosoppressi. Bambini in

terapia con aspirina dovrebbero anche essere immunizzati a causa del rischio di sindrome di Reye.

- Categoria 2- contatti con persone ad alto rischio – personale sanitario, persone che si curano di persone anziane o di pazienti ad alto rischio, e persone che vivono con persone ad alto rischio.
- Categoria 3 – vaccinazione sul posto di lavoro
- Categoria 4 – protezione personale

Raccomandazioni australiane (Hall 2002) –

- Chiunque di eta' superiore o uguale ai 65 anni
- Aborigeni e abitanti dell'isola di Torres Straits di eta' superiore o uguale a 50 anni
- Persone di 6 mesi di eta' o di eta' superiore con malattia cronica che ha richiesto cure mediche regolari o ospitalizzazione nell'anno precedente
- Persone di 6 mesi di eta' o di eta' superiore con malattia cronica polmonare o del sistema circolatorio (esclusa l'asma)
- Resisdenti di case di cura o di istituzioni di cura a lungo termine
- Bambini ed asdolescenti di eta' fra i 6 mesi e i 18 anni in teraopia con aspirina a lungo termine (perche' l'aspirina li mette a rischio di sindrome di Reye se sviluppano febbre)
- Personale sanitario ed altre persone che si curano dei gruppi a rischio menzionati sopra
- Altri gruppi per cui l'immunizzazione contro l'influenza dovrebbe essere considerata incluse donne in gravidanza, turisti internazionali e persone infette con HIV.

La maggior parte delle naziioni che hanno raccomandazioni hanno raccomandazioni simili. Il Canada, pur avendo raccomandazioni simili per quanto riguarda i gruppi prioritari, incoraggia attivamente la vaccinazione di tutte le persone di eta' superiore ai 6 mesi (Orr 2004).

Se una pandemia dovesse diventare realta', le raccomandazioni verranno probabilmente estese a tutti. Tuttavia, lavoratori al

fronte come personale sanitario cosi' come polizia e personale militare, potrebbero diventare di priorita'.

Controindicazioni

Le controindicazioni al vaccino antinfluenzale sono:

- Allergia all'uovo – i vaccini sono manufatti in uova e, sebbene rare, reazioni severe allergiche come anafilassi possono avere luogo
- Malattia febbrile acuta – la vaccinazione dovrebbe essere rimandata. Malattia lieve come infezioni lievi del tratto respiratorio superiore o rinite allergica non sono controindicazioni.
- Il primo trimestre di gravidanza e' stato indicato in precedenza come controindicazione. Tuttavia, le raccomandazioni ACIP sono cambiate nel 2004 e le raccomandazioni al momento indicano vaccinazione in ogni trimestre (Bettes 2005, Harper 2004).
- L'occorrenza precedente di sindrome Guillain-Barre' e' stata considerata in passato come controindicazione, ma questa non e' piu' considerata tale per l'uso di vaccino inattivato (Fleming 2005).

Le controindicaxioni per la vaccinazione con vaccino vivo attenuato sono (Medimmune 2005):

- Eta' <5 o > 65 anni
- Pazienti immunocompromessi – l'uso di vaccino vivo attenuato e' controindicato e viene consigliato l'uso di vaccini inattivati. Si devono usare precauzioni quando il vaccino vivo viene dato a coloro che possono entrare in contatto con pazienti immunocompromessi, dal momento che questo ha causato controversie nel 2004 quando le scorte di vaccino furono limitate (Manion 2005). Individui infetti con HIV potrebbero non presentare immunosoppressione significativa nei primi anni di infezione con HIV, ed e' accettato che certi vaccini vivi attenuati, come quelli per morbillo e varicella, possono essere usati in questi pazienti. Scarsa informazione e' a disposizione sull'uso di vaccino antinfluenzale vivo attenuato in persone infette con HIV, ma quella a disposizione suggerisce che il vaccino e' sicuro in adulti che

sono nella classe A1-2 cosi' come definita dal CDC, e in bambini che sono nella classe N1-2 o A1-2 cosi' come definita dal CDC, cioe' asintomatici o lievemente sintomatici, con conteggio dei CD4 superiore a 200/µl negli adulti (King 2000, King 2001). Entrambi gli studi hanno concluso che la vaccinazione o l'esposizione inavvertita al virus attenuato non e' probabilmente in grado di risultare in effetti avversi significativi. Tuttavia, bisogna notare che il numero di pazienti coinvolti nello studio era piccolo e, finche' non sono a disposizioni dati sufficenti, bisogna esercitare estrema cura nell'uso di tale vaccino.

- Precedente sindrome Guillain-Barre'
- Bambini di eta' inferiore ai 18 anni a cui viene somministrata aspirina terapeuticamente non dovrebbero ricevere vaccino vivo, ma vaccino inattivato.
- In aggiunta,
    - Non e' stata stabilita la sicurezza del vaccino per pazienti che soffrono d'asma o che soffrono di altre malattie che li mettono a rischio di infezione influenzale wild type.
    - Non e' stata stabilita la sicurezza del vaccino a riguardo della teratogenicita' e secrezione durante l'allattamento in gravidanza e, donne in gravidanza dovrebbero ricevere vaccino inattivato.
    - La somministrazione parenterale e' controindicata – somministrazione mucosale tramite spray nasale e' la somministrazione corretta.
    - Si dovrebbe evitare la somministrazione in concomitanza con altri vaccini – entro 4 settimane prima o dopo un vaccino vivo, e entro 2 settimane prima o dopo un vaccino inattivato.

Dosaggio/uso

Vaccino inattivato

Bambini

- 6-35 mesi – 0.25 ml nella coscia anterolaterale (nel muscolo deltoide solo se presente adeguata muscolatura)

- 3-8 anni – 0.5 ml nella coscia anterolaterale (nel muscolo deltoide come sopra)

Adulti

- Dai 9 anni in poi – 0.5 ml nel muscolo deltoide

Vaccino vivo attenuato

Bambini (5-8 anni)

- Prima vaccinazione – 2 dosi a 60 giorni di distanza
- Vaccinati in precedenza – 1 dose per stagione

Adulti (9-49 anni)

- 1 dose per stagione

Compagnie and Prodotti

La pagina web dell'FDA sui vaccini antinfluenzali puo essere trovata al seguente indirizzo:

http://www.fda.gov/cber/flu/flu.htm

La Tavola 2 mostra alcuni dei vaccini antinfluenzali a disposizione, con links all'FDA e ai dati inseriti nella confezione.

Tavola 2. Vaccini antinfluenzale e ditte produttrici.

Produttore	Nome commerciale	Pagina FDA	Foglietto illustrativo
Sanofi Pasteur	Fluzone	http://www.fda.gov/cber/products/inflave071405.htm	http://poisonevercure.150m.com/vaccines/package_inserts/AP-Fluzone_2003-04.pdf
	Fluzone - preservative free	http://www.fda.gov/cber/products/inflave071405p2.htm	
	Inactivated Influenza Vaccine (Split Virion) BP		http://emc.medicines.org.uk/eMC/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=6207
	Inactivated Influenza Vaccine (Split Virion) For Paediatric Use		http://emc.medicines.org.uk/eMC/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=16610
	Inflexal V		http://emc.medicines.org.uk/eMC/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=13078
	Vaxigrip		http://www.medsafe.govt.nz/Profs/Datasheet/v/Vaxigripinj.htm

	Mutagrip		http://home.intekom.com/pharm/ranbaxy/mutagrip.html
Glaxo SmithKline	Fluarix	http://www.fda.gov/cber/products/inflgla083105.htm	http://emc.medicines.org.uk/emc/assets/c/html/displaydoc.asp?documentid=2038
Chiron Vaccines	Fluvirin	http://www.fda.gov/cber/products/inflchi091405.htm	http://home.intekom.com/pharm/cipla/fluvirin.html
	Enzira		http://emc.medicines.org.uk/eMC/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=16606
Wyeth	Agrippal		http://emc.medicines.org.uk/eMC/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=7788
Solvay Healthcare	Influvac Sub-Unit		http://emc.medicines.org.uk/eMC/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=2080
	Invivac		http://emc.medicines.org.uk/eMC/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=15191
MASTA			http://emc.medicines.org.uk/eMC/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=12737
SmithKline Beecham			
MedImmune Vaccines		http://www.fda.gov/cber/products/inflmed081805.htm	http://poisonevercure.150m.com/vaccines/package_inserts/flumist.pdf

*FluMist e' l'unico vaccino vivo attenuato a disposizione al momento. Tutti gli altri sono inattivati.

Strategie per l'uso di vaccino a disponibilita' limitata

Metodi per risparmiare l'antigene

Sono stati analizzati numerosi metodi per ridurre la quantita' di antigene necessaria nella preparazione di vaccino. I piu' importanti sono l'uso di adiuvanti e lo sfruttamento della parte del sistema immunitario designata per lo stimolo della risposta immunitaria – le cellule dendritiche.

Gli adiuvanti sono usati in numerosi vaccini in uso corrente, come quelli contro la difteriite/tetano/pertosse (DtaP) e contro *Haemophilus influenzae* (Hib). Esempi di adiuvanti includono alum (una combinazione di composti dell'alluminio), liposomi, emulsioni come MF59, proteine della capsula di *Neisseria meningitidis*, complessi immunostimolanti (ISCOMs) e interleuchina-2. Questi aumentano la risposta immunitaria al vaccino, permettendo la somministrazione di una dose inferiore pur mantenendo una

sufficente risposta protettiva (Couch 1997, Langley 2005, Potter 2004).

Le cellule dendritiche possono essere sfruttate quando il vaccino e' somministrato per via intradermale, dato che esse inducono risposta delle cellule T, cosi' come formazione di anticorpi cellule T-dipendenti (La Montagne 2004, Steinman 2002). La vaccinazione intradermale e' ben stabilita con epatite B e vaccino contro la rabbia, ed e' stata recentemente analizzata con successo considerevole per i vaccini antinfluenzali (e in uno studio del 1948 (Weller 2005). Il 40%, 20% e 10% della dose standard intramuscolare di 15 µg di antigene somministrata per via intradermale produce una risposta simile a quella della dose intera somministrata per via intramuscolare (Belshe 2004, Cooper 2004, Kenney 2004). Nonostante il titolo degli anticorpi sia protettivo, i livelli possono non essere cosi' duraturi come quelli indotti da vaccinazione intramuscolare. Soggetti di eta' superiore ai 60 anni sembrano avere una risposta immunitaria piu' debole con la vaccinazione intradermale, e sembra probabile che l'iniezione intramuscolare verra' prescelta per questo gruppo (Belshe 2004). Un altro punto non ancora chiarito e' la relazione dose-risposta tra le vie intramuscolare ed intradermale (Kilbourne 2005). Ulteriori studi chiarificheranno queste questioni. Uno svantaggop e' che le reazioni locali possono essere piu' intense con aumentato dolore, gonfiore e rossoro; in ogni caso queste sono comunque lievi.

Razionamento e controversie

Nell'eventualita' di una scarsezza di vaccino, come capito' durante la stagione influenzale 2004/5, cosi' come in caso di una situazione pandemica, certi individui, come i dipendenti del settore sanitario e dell'industria del pollame, e quelli esposti in prima linea, avranno priorita' di accesso al vaccino rispetto ad altri gruppi. Come accaduto nel passato, persone in posizione di comando potrebbero avere il compito di identificare gruppi che necessitano vaccinazione urgente per poter permettere il funzionamento massimo dei servizi essenziali, mentre altri gruppi potrebbero dover attendere fino ad una maggiore disposiione di vaccino (MacReady 2005, Treanor 2004). Nel caso di una pandemia, questo potrebbe diventare problematico, ma la recente esperienza della stagione 2004/5 ha mostrato che la scarsezza di vaccino venne gestita bene dalla maggioranza (Lee 2004), con solo certe situazioni in cui compagnie private comprarono eccesso di vaccino lasciando studi medici privati e servizi di salute pubblica senza scorte (MacReady 2005). Nel Regno Unto, ci sono gia' stati dibattiti su chi dovrebbe rivevere il vaccino antipandemico per

primo – lavoratori del settore sanitario o dell'industria del pollame – se l'influenza aviaria H5N1 dovesse raggiungere la Gran Bretagna (Day 2005).

Vaccino antipandemico

Questa sezione non ha lo scopo di essere una referenza esaustiva sullo sviluppo del vaccino antinfluenzario aviario. Si tratta di un campo che sta avanzando rapidamente, e i risultati ottenuti da coloro coinvolti probabilmente cambieranno la faccia della scienza della vaccinazione antinfluenzale e della vaccinologia in generale. Fra 10 anni, e' probabile che guardando indietro ai vaccini disponibili al momento li penseremo come primitivi. I dettagli e gli avanzamenti notati ora saranno datati domani. Questa sezione provvede uno schema della direzione corrente, dei problemi che devono essere affrontati al momento, e di dove si spera ci troveremo in un prossimo futuro.

Sviluppo

Come abbiamo visto, la vaccinazione antinfluenzale e' un'arma cruciale, non solo nella lotta stagionale all'influenza, ma contro una pandemia che potrebbe accadere domani, l'anno prossimo, o nel prossimo decennio. Ci dobbiamo preparare ora.

L'Organizzazione Sanitaria Mondiale sta lavorando con i capi di stato e i produttori di vaccino di tutto il mondo per prepararsi per la pandemia che molti temono sorgera' dall'influenza aviaria H5N1 che al momento sta provocando serie preoccupazioni (WHO 2005g).

Sebbene sia un processo in continuo mutamento, ceppi iniziali dell'influenza aviaria H5, come A/Duck/Singapore/97 (H5N3), sono stati identificati per l'uso nello sviluppo del vaccino (Stephenson 2005). Tuttavia, bisogna notare che non c'e' concentrazione solo sui ceppi H5 - H2, H6, H7, e H9 non vengono ignorati, sebbene solamente H1, H2, H3, N1 e N2 sono stati trovati nei virus dell'influenza umana (Kilbourne 1997).

I nostri bisogni piu' urgenti sono a) una scorta di farmaci antinfluenzali, b) un vaccino che sia compatibile con il ceppo pandemico, c) analisi veloce ed approvazione del vaccino e, d) la capacita' di produrre vaccino in massa sufficente a provvedere il mondo con una buona difesa. Al momento, tutto questo e' ancora all'inizio.

Un vaccino che sia compatibile con il ceppo pandemico richiede conoscenza dello stesso ceppo e, fino a che la prossima pandemia non incomincia, non sapremo con certezza quale sara' quel ceppo. Al momento gli sforzi vengono fatti con un numero di ceppi, per la maggior parte ceppi H5, visto che questi sembrano i piu' probabili al momento come possibili candidati ad originare una pandemia.

Bisogna sviluppare la tecnologia che permetta lo sviluppo di un tale vaccino in tempo breve. Al momento ci sono numerosi metodi che sono in uso per sviluppare vaccini candidati.

- Sistemi di colture cellulari, usando linee cellulari Vero o MDCK, sono in fase di sviluppo e aumenteranno la nostra capacita' produttiva (Osterholm 2005). Le celle potrebbero venire cresciute su microcarriers – biglie di vetro – per permettere un alto volume di coltura. Tuttavia, questi metodi richiederanno anni prima di essere messi a punto e il costo e' problematico (Fedson 2005).

- La reverse genetics e' in uso per disegnare vaccini candidati – ad esempio, i geni della virulenza di H5N1 sono stati rimossi da un ceppo di laboratorio. L'attenuazione della virulenza del virus e' importante, considerando l'aumentato tasso di mortalita' della corrente influenza aviaria H5N1 altamente patogenica quando riesce ad entrare in un ospite umano. Mentre e' vero che il tasso di mortalita' di H5N1 negli esseri umani al momento non riflette necessariamente il tasso di mortalita in una possibile pandemia, bisogna porre seria attenzione alla patogenicita' del ceppo corrente H5N1 prima che possa essere utilizzato per un vaccino.

- Sono in fase di sviluppo sistemi con plasmidi – numerosi sono in esistenza, ed altri sono stati descritti nella letteratura scientifica. Un virus influenzale generico potrebbe fornire 6 geni nella forma di plasmide e, una volta che il ceppo pandemico venisse identificato questo verrebe utilizzato come fonte dei geni HA e NA. Lo sviluppo di vaccini a DNA sta avendo successo limitato.

- H5N3 apatogenico con adiuvante e' sotto analisi – la risposta immunitaria in questo caso sara' solamente contro H5, ma l'aspetto importante in questo caso e' l'uso di un ceppo attenuato (Horimoto 2001).

- E' sotto considerazione l'uso di virus del raffreddore vivo ed attenuato. Questo, pero', potrebbe anche aprire nuove

porte per potenziali riassortimenti e potrebbe richiedere un tempo considerevole per dimostrarne la sicurezza in certe popolazioni, come gli anziani e i bambini.

- Vaccini inattivati H5N2 esistono per il pollame e sembra che abbiano fornito protezione contro H5N1 nel 2002 e nel 2004, ma ci si aspetta che i vaccini umani richiederanno una maggiore compatibilita' col ceppo pandemico rispetto ai vaccini del pollame (Lipatov 2004).

Vaccini Mock

Per essere sicuri che, quando sara' il momento, si sara' in grado di produrre un vaccino rapidamente e che si sara' in grado di dimostrarne la sicurezza, imunogenicita' e grado di protezione, il WHO ha chiesto a produttori di vaccini e agli scienziati di iniziare lo sviluppo di nuovi vaccini basati su ceppi che potrebbero essere imparentati al possibile ceppo pandemico. E' possibile che questi vaccini non verranno mai usati, e che il loro sviluppo sara' limitato alla dimostrazione che, nel caso della necessita' di un vaccino antipandemico, si avra' a disposizione sia un buon metodo che una tecnologia testata su vaccini precedenti – ecco perche' il nome "vaccini mock" (vaccini simulati). L'aspetto importante e' lo sviluppo di vaccini stabiliti che non necessitano sperimentazione a lungo termine prima di essere messi sul mercato. Questi devono contenere antigeni virali sconosciuti al sistema immunitario umano, come gli antigeni H5N1, e le compagnie produttrici devono condurre studi clinici per determinarne l'immunogenicita', la dose, la sicurezza, e infine essere in possesso della licenza per l'uso con le stesse procedure stringenti in vigore per altri vaccini.

Al momento, e' in vigore un sistema rapido per i vaccini antinfluenzali inattivati contro influenza umana stagionale – tutto il processo, dall'identificazione del ceppo da usare, all'iniezione nello studio medico, richiede circa 6-8 mesi, perche' il vaccino e' stabilito, solamente certi aspetti devono essere confermati prima del rilascio. E' necessario che questo stesso sistema sia a punto per un vaccino antipandemico (Fedson 2005, WHO 2004a-b).

Produttivita'

In un mondo ideale, si dovrebbero avere a disposizione 12 miliardi di dosi di vaccino monovalente in modo da poter somministrare due dosi a ogni essere umano.

La realta' e' che non abbiamo a disposizione cosi' tanto vaccino.

Al momento, la capacita' produttiva mondiale e' annualmente di 300 milioni di dosi di vaccino trivalente. Questo costituirebbe 900 milioni di dosi monovalenti se tutta la produzione venisse spostata per produrre un vaccino antipandemico. Considerando che sarebbero necessarie almeno due dosi per individuo, la produttivita' corrente potrebbe provvedere solamente a 450 milioni di persone. Questo e' complicato ulteriormente dal fatto che la dose di antigene richiesto non e' ancora nota, anche se studi indicano che potrebbe essere piu' elevata di quella dei vaccini antinfluenzali umani del momento (Fedson 2005).

Il mondo ha gia' sofferto carenze di vaccino – recentemente nella stagione invernale 2004/5, e avvicinandosi alla situazione pericolosamente, nella pandemia del 1968. Inoltre, molte nazioni non possiedono industrie locali che possono produrre vaccino e dovranno contare sulle nazioni che possono. Saranno in grado, quelle nazioni, di condividere le scorte di vaccino?

Transizione

Osterholm si chiede (Osterholm 2005), "Cosa succederebbe se la pandemia dovesse iniziare …"

- Questa notte
- Entro un anno
- Fra dieci anni?

Il New England Journal of Medicine ha pubblicato un'intervista con il Dr Osterholm, che e' disponibile online per l'ascolto o per lo scaricamento:

http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/18/1839/DC1

Se la pandemia dovesse iniziare adesso, dovremmo fare conto su misure non basate sul vaccino per almeno i primi 6 mesi della pandemia, e anche allora, i volumi di vaccino prodotti non sarebbero sufficienti per tutti, e un certo razionamento o lo stabilimento di un sistema di distribuzione delle risorse sarebbero necessari. La produzione di vaccino e farmaci dovrebbe venire aumentata – per lo stadio molto piu' avanzato della pandemia, e non farebbe molta differenza nel tempo immediato. Il sistema sanitario mondiale dovrebbe pianificare bene la distribuzione di vaccino quando le scorte diventeranno disponibili – al momento c'e' da dubitare che riesca a gestire la distribuzione e somministrazione normale dei vaccini, figuriamoci sotto la

pressione che comporterebbe una pandemia. I vaccini potrebbero essere disponibili solo per la seconda ondata della pandemia, che teoricamente tende ad avere mortalita' piu' elevata rispetto all'ondata iniziale.

Se la pandemia dovesse iniziare fra un anno, e' probabile che a quel punto ci sara' abbastanza esperienza nella produzione di vaccini mock, e il vaccino potrebbe essere sviluppato in un periodo sufficientemente breve utilizzando le tecnologie che sono al momento sotto studio. Ci sarebbe comunque un ritardo significativo, ed e' probabile che le quantita' a disposizione saranno ancora insufficenti, con la necessita' di razionamento.

Non sappiamo se una pandemia ci sara' – ma e' essenziale che iniziamo a prepararci fin da adesso. Se la pandemia arrivera' con un ritardo di alcuni anni, e' possibile che avremo la capacita' produttiva necessaria a minimizzarne le conseguenze disastrose.

Soluzioni

Il WHO suggerisce varie strategie per risolvere questi problemi (WHO 2005d) e sta lavorando con governi, scienziati, compagnie produttrici di vaccini e di farmaci, ed altri possibili protagonisti chiave in tutto il mondo per raggiungere una soluzione.

Strategie per lo sviluppo rapido di un vaccino antipandemico

Diminuire il tempo fra l'emergenza di un virus pandemico e l'inizio della produzione commerciale.

1. Vaccini candidati con "caratteristiche simili al ceppo pandemico" devono essere prodotti e analizzati clinicamente. Questo necessita la presenza di un gruppo di valutazione centralizzato che esamini i ristultati degli studi e provveda la licenza per l'uso del vaccino. Non e' pensabile che ogni gruppo di valutazione faccia tutto questo per la propria nazione. Il vaccino richede la valutazione attraverso sperimentazione clinica "mock" perche' possa essere analizzato velocemente – in questo modo, come per il vaccino antinfluenzale correntemente in uso, diventa noto, e solo studi brevi sono necessari per confermarne immunogenicita' e sicurezza.

2. Deve essere sviluppata, a livello mondiale, un'aumentata produttivita' – ad esempio spostando la produzione a vaccini da colture cellulari. Un altro metodo per migliorare la produttivita' e' aumentare

il consumo – l'uso maggiore del vaccino correntemente disponibile, non avra' il solo effetto di diminuire i casi di unfluenza, ma anche quello di prevenire riassortimento in esseri umani infetti con due ceppi di virus contemporaneamente e di permettere un miglioramento in termini di produttivita'.

Miglioramento dell'efficacia del vaccino

1. E' necessario studiare piu' in profondita' metodi che consentono il risparmio di vaccino, come l'iniezione intradermale, perche' si possa risparmiare sulla quantita' di antigene – in questo modo si potrebbe abbassare considerevolmente l'attuale dose richiesta di 1 µg di antigene (per ceppo) dei vaccini correnti. Se potessimo usare un ottavo della dose, le nostre dosi monovalenti disponibili al momento potrebbero essere moltiplicate da 900 milioni a 7.2 miliardi – sufficienti per 3.6 miliardi di persone, piu' della meta' della popolazione mondiale (Fedson 2005).

2. E' necessario valutare gli adiuvanti – se fosse possibile migliorare l'immunogenicita', una quantita' minore di antigene sarebbe necessaria per una risposta immunitaria protettiva.

3. Vaccini "mock-up" devono essere sviluppati ed analizzati cllinicamente per derterminare la formulazione che permette il maggior risparmio di antigene e il miglior piano di vaccinazione. (Fedson 2005, Kilbourne 2005).

4. Bisogna sviluppare nuove tecnologie nella preparazione di vaccini, come reverse genetics e la conoscenza piu' dettagliata degli epitopi dell'influenza in modo da poter progettare vaccini piu' efficienti.

Controversie

E' necessario risolvere certe controversie che circondano lo sviluppo di nuovi vaccini antinfluenzali (Fedson 2005, Osterholm 2005).

Finanziarie – esistono brevetti per i metodi che si basano su plasmidi per la produzione di virus in colture cellulari e bisogna

esaminare e risolvere le implicazioni legali che questi comportano. I propietari intellettuali del brevetto saranno in grado di trarre beneficio dall'uso del metodo? Vaccini "mock" devono essere prodotti, ma probabilmente non verranno mai usati. Chi provvedera' i fondi necessari per questa impresa?

Razionamento – in caso di scarsezza di vaccino, gruppi a maggior rischio dovranno essere vaccinati prima, insieme a coloro che saranno impegnati in prima linea a contenere la pandemia. In questo caso, la definizione "gruppo ad alto rischio" potrebbe richiedere una revisione – includera' tutti i bambini, ad esempio? Chi ricevera' il vaccino per primo – c'e' gia' una certa tensione nel Regno Unito a questo proposito: lavoratori dell'industria del pollame o dipendenti del sistema sanitario? (Day 2005).

Sara' necessario garantire accesso equo – nazioni che non producono vaccino, nazioni piu' povere, e nazioni in via di sviluppo vorranno la loro parte di provviste di vaccino.

Questioni di responsabilita' legale – a causa dell'aumento di vaccinazione con i vaccini disponibili al momento, e' necessario porre attenzione alle responsabilita' legali. Molte nazioni possiedono legislature che limitano e/o coprono certe responsabilita' per le ditte produttrici di vaccino – politiche che incoraggiano tali legislature daranno alle compagnie produttrici piu' liberta' nello sviluppo di nuovi vaccini, ed aumenteranno le provviste di vaccini. Quando sara' il momento di immettere nell'uso generale vaccini antipandemici, tali legislature saranno importanti.

Organizzazione

Barnett usa una Haddon Matrix per dimostrare che tipo di pianificazione sara' necessaria nei diversi stadi di una pandemia, da pre-pandemico a post-pandemico (Barnett 2005).

Il WHO giochera' un ruolo importante in questo processo. Nel 2001, venne stabilita l'Agenda Globale per la Sorveglianza e il Controllo dell'Influenza (Global Agenda for Influenza Surveillance and Control) (Webby 2003, Stohr 2005). Il suo ruolo e' quello di migliorare le nostre' capacita' nella sorveglianza, in modo da essere meglio equipaggiati per individuare una possibile pandemia, e per essere nel frattempo preparati per la stagione influenzale. Un'altro incarico e' quello di aumentare la nostra conoscenza dell'influenza, e migliorare il consenso verso il vaccino e il suo utilizzo, in modo da essere preparati per una pandemia (WHO 2005j).

Il WHO ha anche bisogno di essere alla guida nell'indirizzare i problemi relativi alla capacita' produttiva, alla disponibilita' di legislatura e di metodi veloci per ottenere il vaccino, e alla ricerca che e' necessario condurre per arrivare al punto in cui tutto questo diventera' una realta'. Deve aiutare a risolvere le controversie che riguardano il finanziamento, i brevetti e la proprieta' intellettuale, equita' per le nazioni in via di sviluppo e per quelle che non producono vaccino, e il razionamento del vaccino quando le scorte non sono sufficenti per una popolazione di piu' di 6 miliardi di persone.

Il mondo ideale – 2025

"Il nostro scopo dovrebbe essere quello di sviluppare un vaccino basato sulle colture cellulari che includa antigeni che sono presenti in tutti i sottotipi del virus dell'influenza, che non cambi di anno in anno, e che sia disponibile per tutta la popolazione mondiale. Abbiamo bisogno di un approccio internazionale alla distribuzione di finanziamenti che garantisca i fondi necessari per l'eccesso nella produzione durante una pandemia." (Osterholm 2005)

Referenze

Materiale interessante da leggere e da ascoltare

Audio

- Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. N Engl J Med 2005; 352: 1839-42. Audio content: http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/18/1839

- Belshe RB. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. N Engl J Med 2005; 353: 2209-11. Audio content: http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/21/2209

Online reading sources

- US Department of Health and Human Services. The official U.S. government Web site for information on pandemic flu and avian influenza. http://pandemicflu.gov/research/

- Centers for Disease Control (CDC), USA. Influenza (flu). http://www.cdc.gov/flu/

- World Health Organisation (WHO). Epidemic and Pandemic Alert and Response Influenza. http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/index.html
- World Health Organisation (WHO). Epidemic and Pandemic Alert and Response Avian Influenza. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html
- World Health Organisation (WHO). Responding to the avian influenza pandemic threat. Recommended strategic actions. 2 September 2005 http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_8/en/index.html
- WHO. Recommendations for Influenza Vaccine Composition. http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations1/en/
- Journal of Infectious Diseases, 1997, vol 176, suppl 1, Pandemic Influenza: Confronting a Re-emergent Threat http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/contents/v176nS1.html

Sources

1. Baker JP, Katz SL. Childhood vaccine development: an overview. Pediatr Res 2004; 55: 347-56. Epub 2003 Nov 19. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14630981

2. Barnett DJ, Balicer RD, Lucey DR, et al. A Systematic Analytic Approach to Pandemic Influenza Preparedness Planning. PLoS Med 2005; 2: http://amedeo.com/lit.php?id=16255619

3. Beare AS, Schild GC, Craig JW. Trials in man with live recombinants made from A/PR/8/34 (H0 N1) and wild H3 N2 influenza viruses. Lancet 1975; 2: 729-32. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=52768

4. Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. http://amedeo.com/lit.php?id=16192482

5. Belshe RB, Newman FK, Cannon J, et al. Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. N Engl J Med 2004; 351: 2286-94. Epub 2004 Nov 3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15525713

6. Belshe RB. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. N Engl J Med 2005; 353: 2209-11. http://amedeo.com/lit.php?id=16306515; for audio content: http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/21/2209/DC1

7. Bettes B, Hawks D, Schulkin J. Influenza Vaccination in Pregnancy: Practices Among Obstetrician-Gynecologists --- United States, 2003--04 Influenza Season. MMWR Weekly 2005; 54: 1050-1052. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5441a4.htm

8. Bridges CB, Thompson WW, Meltzer MI, et al. Effectiveness and cost-benefit of influenza vaccination of healthy working adults: A randomized controlled trial. JAMA 2000; 284: 1655-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11015795

9. Centres for Disease Control. Interim Guideline: Planning for a Possible U.S. Influenza Vaccine Shortage, 2005-06. (Accessed on 20 November 2005 at http://www.cdc.gov/flu/professionals/vaccination/pdf/vaccshortguide.pdf)

10. Cooper CL, Davis H, Cameron DW. Influenza vaccination with 1/10th the full dose. N Engl J Med 2004; 351: 2339-40. http://amedeo.com/lit.php?id=15564552

11. Couch RB, Keitel WA, Cate TR. Improvement of inactivated influenza virus vaccines. J Infect Dis 1997; 176: Suppl 1: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9240693

12. Cassetti MC, Couch R, Wood J, Pervikov Y. Report of meeting on the development of influenza vaccines with broad spectrum and long-lasting immune responses, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 26-27 February 2004. Vaccine 2005; 23: 1529-33. http://amedeo.com/lit.php?id=15754468

13. Day M. Experts disagree over who should get avian influenza vaccine. BMJ 2005; 331: 986. http://amedeo.com/lit.php?id=16254300

14. Fedson DS. Preparing for pandemic vaccination: an international policy agenda for vaccine development. J Public Health Policy 2005; 26: 4-29. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15906873

15. Fleming D. Influenza pandemics and avian flu. BMJ 2005; 331: 1066-9. http://amedeo.com/lit.php?id=16269494

16. Glezen WP, Piedra PA, Longini IM, Halloran ME. Safety of cold-adapted live influenza vaccine. Pediatr Infect Dis J 2004; 23: 593-4 http://amedeo.com/lit.php?id=15194854

17. Govaert TM, Thijs CT, Masurel N, Sprenger MJ, Dinant GJ, Knottnerus JA. The efficacy of influenza vaccination in elderly individuals. A randomized double-blind placebo-controlled trial. JAMA 1994; 272: 1661-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7966893

18. Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Levandowski RA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. A meta-analysis and review of the literature. Ann Intern Med 1995; 123: 518-27. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7661497

19. Gurfinkel EP, Leon de la Fuente R, Mendiz O, Mautner B. Flu vaccination in acute coronary syndromes and planned percutaneous coronary interventions (FLUVACS) Study. Eur Heart J 2004; 25: 25-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14683739

20. Haber P, DeStefano F, Angulo FJ, et al. Guillain-Barre syndrome following influenza vaccination. JAMA 2004; 292: 2478-81. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15562126

21. Hall R. Influenza vaccination. Australian Prescriber 2002; 25:5-7.

22. Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2004; 53: 1-40. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15163927

23. Hien TT, de Jong M, Farrar J. Avian influenza--a challenge to global health care structures. N Engl J Med 2004; 351: 2363-5. http://amedeo.com/lit.php?id=15575048

24. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. Vaccine 2002; 20: 3068-87. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12163258

25. Hilleman MR. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. Vaccine 2000; 18: 1436-47. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10618541

26. Hoffmann E, Mahmood K, Chen Z, et al. Multiple gene segments control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66. J Virol 2005; 79: 11014-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16103152

27. Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 129-49. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11148006

28. Joseph C, Elgohari S, Nichols T, Verlander N. Influenza vaccine uptake in adults aged 50-64 years: Policy and practice in England 2003/2004. Vaccine 2005; Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16289767

29. Kenney RT, Frech SA, Muenz LR, Villar CP, Glenn GM. Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. N Engl J Med 2004; 351: 2295-301. Epub 2004 Nov 3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15525714

30. Kilbourne ED. Intradermal vaccination against influenza. N Engl J Med 2005; 352: 1044-6 http://amedeo.com/lit.php?id=15762000

31. Kilbourne ED. Perspectives on pandemics: a research agenda. J Infect Dis 1997; 176: Suppl 1: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9240691

32. King JC Jr, Fast PE, Zangwill KM, et al. Safety, vaccine virus shedding and immunogenicity of trivalent, cold-adapted, live attenuated influenza vaccine administered to human immunodeficiency virus-infected and noninfected children. Pediatr Infect Dis J 2001; 20: 1124-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11740317

33. King JC Jr, Treanor J, Fast PE, et al. Comparison of the safety, vaccine virus shedding, and immunogenicity of influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live cold-adapted, administered to human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected adults. J Infect Dis 2000; 181: 725-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10669363

34. La Montagne JR, Fauci AS. Intradermal influenza vaccination--can less be more? N Engl J Med 2004; 351: 2330-2. Epub 2004 Nov 3. http://amedeo.com/lit.php?id=15525715

35. Langley JM, Faughnan ME. Prevention of influenza in the general population. CMAJ 2004; 171: 1213-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15534315

36. Langley JM, Halperin SA, McNeil S, et al. Safety and immunogenicity of a Proteosometrade mark-trivalent inactivated influenza vaccine, given nasally to healthy adults. Vaccine 2005; Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16303215

37. Lasky T, Terracciano GJ, Magder L, et al. The Guillain-Barre syndrome and the 1992-1993 and 1993-1994 influenza vaccines. N Engl J Med 1998; 339: 1797-802. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9854114

38. Lee TH. Rationing influenza vaccine. N Engl J Med 2004; 351: 2365-6. http://amedeo.com/lit.php?id=15575049

39. Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, et al. Influenza: emergence and control. J Virol 2004; 78: 8951-9. http://amedeo.com/lit.php?id=15308692

40. Macready N. Distribution anomalies hinder access to flu vaccine in the US. BMJ 2005; 331: 1044. http://amedeo.com/lit.php?id=16269489

41. Manian FA. Intradermal vaccination against influenza. N Engl J Med 2005; 352: 1044-6 http://amedeo.com/lit.php?id=15761999

42. MedImmune Vaccines, Inc. FluMist 2005-2006 Formula. 2005. http://www.fda.gov/cber/label/inflmed080505LB.pdf

43. Monto AS. Preventing influenza in healthy adults: the evolving story. JAMA 2000; 284: 1699-701. http://amedeo.com/lit.php?id=11015802

44. Musana KA, Yale SH, Mazza JJ, Reed KD. Practical considerations to influenza vaccination. Clin Med Res 2004; 2: 256-9. http://amedeo.com/lit.php?id=15931366

45. Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 16825-9. Epub 2005 Nov 2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16267134

46. Nichol KL, Margolis KL, Wuorenma J, Von Sternberg T. The efficacy and cost effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community. N Engl J Med 1994; 331: 778-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8065407

47. Orr P. An Advisory Committee Statement (ACS). National Advisory Committee on Immunization (NACI). Statement on influenza vaccination for the 2004-2005 season. Can Commun Dis Rep 2004; 30: 1-32. http://amedeo.com/lit.php?id=15239483

48. Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. N Engl J Med 2005; 352: 1839-42. http://amedeo.com/lit.php?id=15872196; for audio content: http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/18/1839/DC1

49. Pachucki CT, Pappas SA, Fuller GF, Krause SL, Lentino JR, Schaaff DM. Influenza A among hospital personnel and patients. Implications for recognition, prevention, and control. Arch Intern Med 1989; 149: 77-80. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2912418

50. Palese P, Zavala F, Muster T, Nussenzweig RS, Garcia-Sastre A. Development of novel influenza virus vaccines and vectors. J Infect Dis 1997; 176: Suppl 1: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9240694

51. Palese P (2002a), Garcia-Sastre A. New directions in vaccine research. J Clin Invest 2002; 109: 1517-8. http://amedeo.com/lit.php?id=12070295

52. Palese P (2002b), Garcia-Sastre A. Influenza vaccines: present and future. J Clin Invest 2002; 110: 9-13. http://amedeo.com/lit.php?id=12093881

53. Piedra PA, Gaglani MJ, Riggs M, et al. Live attenuated influenza vaccine, trivalent, is safe in healthy children 18 months to 4 years, 5 to 9 years, and 10 to 18 years of age in a community-based, nonrandomized, open-label trial. Pediatrics 2005; 116: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16140685

54. Pirofski LA, Casadevall A. Use of licensed vaccines for active immunization of the immunocompromised host. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 1-26. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9457426

55. Potter CW. Influenza. In: Zuckerman AJ, Pattison JR, Banatvala JE, editors. Principles and Practice of Clinical Virology. 5th ed. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2005;271-297.

56. Potter J, Stott DJ, Roberts MA, et al. Influenza vaccination of health care workers in long-term-care hospitals reduces the mortality of elderly patients. J Infect Dis 1997; 175: 1-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8985189

57. Public Health Agency of Canada. Statement on influenza vaccination for the 2004-2005 season. Canada Communicable Disease Report 2004; 30: ACS-3. (Accessed on 29 November 2005 at http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04pdf/acs-dcc-30-3.pdf)

58. Schoub BD. Recommendations pertaining to the use of viral vaccines: influenza, 2005. S Afr Med J 2005; 95: 104. http://amedeo.com/lit.php?id=15751203

59. Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. J Clin Invest 2002; 109: 1519-26. http://amedeo.com/lit.php?id=12070296

60. Stephenson I, Bugarini R, Nicholson KG, et al. Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. J Infect Dis 2005; 191: 1210-5. Epub 2005 Mar 14. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15776364

61. Stohr K. Avian influenza and pandemics--research needs and opportunities. N Engl J Med 2005; 352: 405-7. Epub 2005 Jan 24. http://amedeo.com/lit.php?id=15668221

62. Treanor J. Weathering the influenza vaccine crisis. N Engl J Med 2004; 351: 2037-40. Epub 2004 Oct 18. http://amedeo.com/lit.php?id=15492296

63. Voordouw AC, Sturkenboom MC, Dieleman JP, et al. Annual revaccination against influenza and mortality risk in community-dwelling elderly persons. JAMA 2004; 292: 2089-95. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15523069

64. Wadman M. Race is on for flu vaccine. Nature 2005; 438: 23. http://amedeo.com/lit.php?id=16267526

65. Webby RJ, Webster RG. Are we ready for pandemic influenza? Science 2003; 302: 1519-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14645836

66. Weller TH. Intradermal vaccination against influenza. N Engl J Med 2005; 352: 1044-6 http://amedeo.com/lit.php?id=15758019

67. WHO 2003. Influenza Fact Sheet. (Accessed on 15 December 2005 at http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html)

68. WHO 2004a. Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses - Interim biosafety risk assessment. (Accessed on 26 April 2005 at http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_RMD_2003_5/en/index.html)

69. WHO 2004b. Vaccines for pandemic influenza. (Accessed on 30 November 2005 at http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2004_3/en/)

70. WHO 2005a The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1515-1521. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16318689

71. WHO 2005b. WHO intercountry-consultation. Influenza A/H5N1 in humans in Asia. Manila, Philippines, 6-7 May 2005 (Accessed on 1 December 2005 at http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_7_04.pdf)

72. WHO 2005c. Influenza vaccine. (Accessed on 1 December 2005 at http://www.who.int/vaccines/en/influenza.shtml)

73. WHO 2005d. Responding to the avian influenza pandemic threat - Recommended strategic actions. (Accessed on 30 November 2005 at http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_8/en/index.html)

74. WHO 2005e. WHO checklist for influenza pandemic preparedness planning. (Accessed on 26 April 2005 at htt p://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_4/en/)

75. WHO 2005f. Influenza vaccines. Wkly Epidemiol Rec 2005; 80: 279-87. http://amedeo.com/lit.php?id=16171031

76. WHO 2005g. H5N1 avian influenza: first steps towards development of a human vaccine. Wkly Epidemiol Rec 2005; 80: 277-8. http://amedeo.com/lit.php?id=16171030

77. WHO 2005h. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2005-2006 influenza season. Wkly Epidemiol Rec 2005; 80: 71-5. http://amedeo.com/lit.php?id=15771207

78. WHO 2005i. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2006 influenza season. Wkly Epidemiol Rec 2005; 80: 342-7. http://amedeo.com/lit.php?id=16240985

79. WHO 2005j. WHO global influenza preparedness plan. (Accessed on 26 April 2005 at htt p://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5/en/)

80. WHO 2005k. WHO Consultation on the Composition of Influenza Vaccine for the Northern Hemisphere 2006-2007. (Accessed on 15 December 2005 at http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinesnorth2006_7/en/index.html)

81. Wilde JA, McMillan JA, Serwint J, Butta J, OŽRiordan MA, Steinhoff MC. Effectiveness of influenza vaccine in health care professionals: a randomized trial. JAMA 1999; 281: 908-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10078487

82. Youngner JS, Treanor JJ, Betts RF, Whitaker-Dowling P. Effect of simultaneous administration of cold-adapted and wild-type influenza A viruses on experimental wild-type influenza infection in humans. J Clin Microbiol 1994; 32: 750-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8195389

Chapter 7: Risultati di Laboratorio

Gert van Zyl

Introduzione

Da quando il virus dell'influenza fu caratterizzato per la prima volta nel 1933 (Webster 1998), sono state sviluppate varie modalita' diagnostiche. Queste tecniche diagnostiche possono essere utilizzate per confermare la diagnosi clinica. Questo capitolo discute il ruolo delle tecniche piu' importanti cosi' come i loro vantaggi e limitazioni. L'analisi diagnostica migliore, tuttavia, ha poco valore senza la presenza di una raccolta dei campioni di buona qualita' e una corretta informazione da parte del paziente.

Diagnosi in laboratorio dell'influenza umana

Raccolta corretta dei campioni

Campioni dall'apparato respiratorio

E' molto importante raccogliere i campioni al momento giusto dal momento che si ottiene la resa migliore in campioni ottenuti entro quattro giorni dall'inizio dei sintomi. Possono essere usati diversi tipi di campione derivati dall'apparato respiratorio. I lavaggi nasali e gli aspirati nasofaringei tendono ad essere piu' sensibili dei tamponi faringei. In pazienti intubati possono essere raccolti aspirati tracheali e lavaggi bronchiali (WHO 2005a). I lavaggi e gli aspirati dovrebbero contenere epitelio respiratorio sufficente per analisi con immunofluorescenza. Campioni senza un numero sufficente di cellule possono comunque venire utilizzati per altri metodi come il rivelamento rapido di antigene, isolamento del virus e reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR).

I tamponi devono essere trasportati in medium di trasporto per il virus per prevenire il dissecamento.

E' consigliabile che tutti i campioni arrivino in laboratorio al piu' presto possibile per evitare degradazione. Si raccomanda che il trasporto in medium di trasporto per il virus avvenga in ghiaccio o con refrigerazione a 2-8º C se si aspettano ritardi.

Campioni di sangue

Campioni di sangue (sangue intero, siero) vengono raccolti per effettuare la serologia anticorpale (che determina la presenza degli anticorpi contro l'influenza). Campioni di siero da pazienti in fase acuta o convalescenti a distanza di 14-21 giorni dovrebbero essere raccolti per dimostrare un aumento significativo (di almeno quattro volte) nel titolo di anticorpi specifici per un determinato ceppo.

Ruolo clinico e valore della diagnosi in laboratorio

Gestione del paziente

Una diagnosi rapida e' importante se si considerano interventi precoci con costosi farmaci antivirali – perche' siano effettivi la somministrazione di questi farmaci deve iniziare entro le 48 ore dall'inizio dei sintomi (WHO 2005a). I candidati per questo tipo di trattamento sono pazienti con altre malattie e ad alto rischio di compilicazioni gravi (vedi capitolo "Presentazione clinica"). In particolare, la diagnosi di influenza in pazienti anziani mette il medico in allarme per il rischio sostanziale di infezioni batteriche secondarie con *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*.

In aggiunta, l'analisi rapida per l'identificazione del virus dell'influenza gioca un ruolo nel controllo di infezioni nosocomiali e nella riduzione del passaggio dell'infezione da paziente a paziente o da personale sanitario infetto a pazienti ad alto rischio. Queste analisi possono anche essere usate per diagnosticare l'influenza in persone in viaggio o nelle epidemie in comunita' semi chiuse come ad esempio le persone che partecipano ad una crociera (turisti e personale di servizio) (WHO 2005a).

Infine, la diagnosi di influenza ha valore prognostico in adulti giovani ed altrimenti sani in cui la malattia ha decorso benigno e breve.

Sorveglianza

La sorveglianza a sentinella dell'influenza usa una varieta' di analisi e sembra che ci sia una mancanza di standardizzazione persino all'interno della regione Europea (Meerhoff 2004). Techniche diverse hanno svantaggi e vantaggi diversi. Di conseguenza, per la sorveglianza viene usata una combinazione di analisi. Tecniche di rilevazione rapide come la RT-PCR (Bigl 2002) o EIA permettono di evidenziare velocemente le epidemie e possono essere utilizzate per distinguere fra influenza A o B. Per caratterizzare il sottotipo i virus devono essere isolati in uova di gallina embrionate o in colture cellulari. I sottotipi di emagglutinina e neuraminidasi sono determinati tramite l'analisi di inibizione dell'emagglutinizazione e di RT-PCR rispettivamente. Il sequenziamento dei prodotti della PCR viene usato per stabilire l'epidemiologia molecolare dei virus circolanti. Questo, insieme ai titoli di inibizione dell'emagglutinina interceppo, permette al WHO di raccomandare i vaccini piu' adeguati a garantire protezione contro i ceppi di influenza circolanti. La sorveglianza e' importante anche per le politiche di salute pubblica visto che l'impatto sulla salute di una epidemia particolare e la relazione costi e benefici per interventi come la vaccinazione possono motivare le persone responsabili per queste politiche a dare priorita' alla prevenzione dell'influenza.

Analisi di laboratorio

Molti fattori dovrebbero essere presi in considerazione per decidere quale analisi usare. La sensibilita', la specificita', il tempo richiesto per ottenere il risultato, la ripetibilita', la facilita' di esecuzione e il costo devono essere presi in considerazione. La RT-PCR e' generalmente piu' sesibile rispetto a serologia e

colture e la combinazione di RT-PCR con la serologia e' piu' sensibile di qualunque altra combinazione degli altri due metodi (Zambon 2001). La sensibilita' delle colture e' in gran parte dipendente dal laboratorio in cui viene eseguita. La serologia tende ad essere meno costosa di RT-PCR ma dal momento che richiede campioni di sangue da pazienti in fase acuta e convalescenti, la diagnosi e' solo retrospettiva. Le colture tradizionali sono lunghe da eseguire ma le tecniche di coltura in shell vial permettono una diagnosi entro 48-72 ore.

Metodi diretti

Esistono metodi diversi per l'identificazione diretta dei virus dell'influenza. Certi metodi, come le analisi immunologiche con enzimi (EIAs) possono essere utili per analisi sul posto, altri come immunofluorescenza diretta, permettono la preparazione di vetrini sul posto e in cliniche e la spedizione dei vetrini fissati ad un laboratorio centralizzato (Allwinn 2002). La RT-PCR puo' essere eseguita solo in laboratori equipaggiati da personale specializzato. Questi metodi possono rivelare l'influenza A e B o differenziare fra tipo A o B. L'unica tecnica diretta che ha il potenziale di differenziare fra i sottotipi (ad esempio sulla base di emagglutinina e neuraminidase) e' la RT-PCR.

Immunofluorescenza

Per l'immunofluorescenza diretta, cellule epiteliali dell'apparato respiratorio potenzialmente infette, vengono fissate su un vetrino e gli antigeni virali contenuti nelle cellule sono rivelati da anticorpi specifici che sono o direttamente coniugati con un colorante fluorescente (immunofluorescenza diretta) o da anti-anticorpi legati ad un colorante fluorescente (immunofluorescenza indiretta). In entrambi i casi le reazioni vengono osservate al microscopio a fluorescenza e le cellule positive sono individuate in base all'intensita' del colore e alla morfologia delle aree fluorescenti. L'immunofluorescenza diretta permette risultati piu' veloci, ma e' generalmente meno sensibile dell'immunofluorescenza indiretta. L'immunofluorescenza indiretta ha anche il vantaggio di poter utilizzare antisieri misti per identificare infezione virale usando un singolo anti-anticorpo coniugato ad un colorante fluorescente (gli anticorpi piu' comunemente usati sono anticorpi anti-topo coniugati con fluorisceina isotiocianato; Stevens 1969). L'immunofluorescenza permette la diagnosi rapida di campioni respiratori quando e' presente nel campione un numero sufficente di cellule epitelliali dell'apparato respiratorio. Tuttavia, e' nota una variazione fra individui nel riportare i risultati di immunofluorescenza dal momento che l'interpretazione dei risultati e' individuale e la precisione dipende dalla competenza e esperienza dell'operatore.

Analisi immunoenzimatiche o analisi immunocromatografiche

Le analisi immunoenzimatiche (EIAs) usano anticorpi diretti contro antigeni virali coniugati ad un enzima. A questo segue un passaggio di incubazione con un substrato cromogenico e la presenza di antigene virale e' indicata da un cambio di colore. Certe analisi immunoenzimatiche cosi' come analisi simili che usano immunocromatografia, permettono analisi sul posto (Allwinn 2002) e richiedono 10-30 minuti. Queste analisi rapide sono generalmente piu' costose della immunofluorescenza diretta o delle colture virali. La sensibilita' degli EIAs varia fra 64% e 78% (Allwinn 2002). Vari test rapidi possono rivelare virus dell'influenza A e B senza distinguerne il tipo, solo il virus dell'influenza A o identificare sia

influenza A che B ed identificarne il tipo. Tuttavia, nessuna di queste analisi rapide puo' differenziare fra i sottotipi che sono infettivi per gli esseri umani (H1N1 e H3N2) o tra i sottotipi di influenza aviaria (FDA, 2005). Una lista delle analisi rapide che sono disponibili puo' essere ottenuta dal link seguente: http://www.cdc.gov/flu/professionals/labdiagnosis.htm.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

In RT-PCR l'RNA e' in primo luogo convertito in DNA complementare (cDNA). Successivamente una sezione del genoma e' amplificata usando primers che si legano in maniera specifica ad un'area bersaglio del cDNA. Questo permette, tramite l'azione di una DNA polimerasi termostabile,l'amplificazione esponenziale di piccole quantita' di acido nucleico e il rilevamento ad alta sensibilita' di quantita' minute di genoma virale.

Non solo la RT-PCR ha elevata sensibilita' (Steininger 2002), ma puo' anche venire utilizzata per differenziare fra sottotipi e per condurre analisi filogenetiche (Allwinn 2002). La degradazione dell'RNA in campioni archiviati puo' dimunuire la sensibilita' della RT-PCR (Frisbie 2004). Per questo motivo e' consigliabile che i campioni vengano processati il prima possibile dopo la raccolta.

Metodi di isolamento

L'isolamento o la coltura di virus e' una tecnica che richiede l'inoculo in un sistema di coltura vivente e in cui la presenza di infezione virale viene rivelata nella coltura stessa. Dal momento che la coltura amplifica la quantita' di virus, questa tecnica e' piu' sensibile dei metodi diretti (esclusa la RT-PCR, che anche usa amplificazione). L'isolamento del virus e' possibile solo se il sistema vivente o le cellule sono sensibili per il virus che si vuole isolare.

L'isolamento richiede il trasporto rapido dei campioni al laboratorio dal momento che ritardi possono portare all'inattivazione del virus (Allwinn 2002).

Colture in uova embrionate

I campioni vengono inoculati nella cavita' amniotica di uova di gallina embrionate di eta' 10-12 giorni. Un'alta resa di virus puo' essere ottenuta dopo 3 giorni di incubazione (WHO 2005d).

Dal momento che questa tecnica richiede uova di galline fetrilizzate e incubatori speciali, non e' piu' utilizzata per la diagnosi di routine di infezione con influenza. Tuttavia l'isolamento in uova procura grandi quantita' di vrus ed e' un sistema di coltura molto sensibile. Laboratori di referenza usano questo sistema di coltura per assicurare grande sensibilita' e per permettere la produzione di scorte di virus per il controllo epidemiologico.

Colture cellulari

Colture convenzionali: numerose linee cellulari sono utilizzate per isolare i virus dell'influenza, piu' frequentemente cellule renali di scimmia primarie e cellule canine Madin-Darby (MDCK). Certi autori raccomandano l'uso di tripsina per facilitare l'entrata del virus nelle linee cellulari (WHO 2005d). La coltura cellulare convenzionale richiede fino a due settimane, ma ha sensibilita' molto elevata. E' possibile osservare effetti citopatici come sincizi e corpuscoli di inclusione basofili

intracitoplasmatici. La presenza di virus influenzale puo' essere verificata usando emoassorbimento in eritrociti di cavie (Weinberg 2005) o immunofluorescenza delle cellule in coltura. Nel secondo caso e' anche possibile tipizzare il virus isolato. L'immunofluorescenza ha una sensibilita' maggiore nel rilevamento di colture positive rispetto all'emoassorbimento.

Colture shell vial: la coltura shell vial permette la diagnosi entro 48 ore (Allwinn 2002). Quesro e' possibile dopo la centrifugazione dell'inoculo su un monostrato di coltura cellulare e l'esecuzione di immunofluorescenza prima che gli effetti citopatici possano essere osservati. La coltura in shell vial ha pero' una sensibilita' minore rispetto alle colture convenzionali (Weinberg 2005).

Animali da laboratorio

I furettii sono usati spesso in ricerca come modello di infezione nell'influenza umana, ma non hanno un ruolo nella diagnosi di routine.

Serologia

La serologia si occupa del rilevamento di anticorpi specifici contro il virus dell'influenza nel siero (o in altri fluidi del corpo).

La serologia puo' identificare anticorpi totali o essere classe-specifica (IgG, IgA o IgM).

Diverse tecniche serologiche sono disponibili per la diagnosi di influenza: inibizione dell'emagglutinina (HI), fissazione del complemento (CF), analisi immunoenzimatica (EIA), e immunofluorescenza indiretta.

La diagnosi serologica ha poco valore nell'influenza acuta. Per diagnosticare infezione acuta, un aumento di almeno quattro volte nei titoli di anticorpi deve essere dimostrato, il che richiede sia campioni da pazienti in fase acuta sia da pazienti convalescenti. Puo' pero' avere valore nella diagnosi di pazienti infetti in un tempo recente.

La serologia e' usata anche per determinare la risposta alla vaccinazione antinfluenzale (Prince 2003).

La serologia ha un valore clinico maggiore in pazienti pediatrici senza precedente esposizione all'influenza dal momento che precedente esposizione puo' portare a risposte anticorpali eterologhe (Steininger 2002).

Inibizione dell'emagglutinina (HI)

Le analisi HI richiedono molto lavoro e tempo e necessitano numerosi controlli per la standardizzazione. Tuttavia, i reagenti necessari sono a buon mercato e generalmente disponibili. Per l'analisi vengono usati svariati tipi di eritrociti come quelli di cavie, uccelli acquatici e umani tipo "O". Generalmente vengono utilizzati con diluizione 0.4-0.5%. Il siero viene pretrattato per rimuovere emagglutinine non specifiche ed inibitori. Successivamente, una preparazione dell'emagglutinina virale che produce emagglutinizzazione visibile (normalmente 4 unita' di emagglutinina) viene pre-incubata con il campione di siero diluito due volte. La diluizione di siero piu' bassa che inibisce emagglutinizzazione e' equivalente al titolo HI. HI e' piu' sensibile della fissazione del complemento (Julkunen 1985, Prince 2003) e ha il valore aggiunto di essere piu' specifica nella differenziazione fra sottotipi HA (Julkunen 1985).

Fissazione del complemento (CF)

Le analisi di fissazione del complemento si basano sull'abilita' dei complessi antigene-anticorpo di consumare complemento – che risulta nella mancanza di complemento disponibile per la lisi di eritrociti di pecora sensibilizzati. Queste analisi richiedono molto lavoro e controlli per ogni procedura, ma i reagenti sono a buon mercato e generalmente disponibili. Analisi CF sono meno sensibili delle analisi HI sia per la diagnosi di infezione acuta che per la determinazione di immunita' dopo la vaccinazione (Prince 2003).

Analisi immunoenzimatiche (EIA)

Le analisi immunoenzimatiche sono piu' sensibili di quelle HI o CF (Bishai 1978, Julkunen 1985). Sono disponibili commercialmente numerosi EIA. Analisi che rivelano IgG e IgA sono piu' sensibili di quelle che rivelano IgM (Julkunen 1985), ma non sono indicative di infezione acuta.

Immunofluorescenza indiretta

L'immunofluorescenza indiretta non viene usata normalmente come metodo per rivelare anticorpi contro il virus influenzale.

Analisi rapide

Il valore clinico di un'analisi diagnostica per l'influenza e' per gran parte dipendente dal tempo che richiede per ottenere il risultato. Le prime analisi diagnostiche che vennero sviluppate per la diagnosi dell'influenza furono l'isolamento del virus e le analisi serologiche. Questi richiedono piu' di due settimane per escludere infezione con influenza. Sebbene le analisi con shell vial abbiano ridotto il tempo richiesto per l'isolamento, esse non vengono considerate generalmente come analisi rapide.

Lo sviluppo di analisi dirette come l'immunofluorescenza ha permesso la diagnosi entro poche ore (da 1 a 2 incubazioni e lavaggi interrmedi). Le analisi con immunofluorescenza richiedono pero' tecnici di laboratorio ben preparati e la disponibilita' di microscopi a fluorescenza.

La rivoluzione nella diagnosi rapida di influenza fu causata dallo sviluppo di analisi rapide con antigene (la maggioranza delle quali usano EIA o un principio di immunocromatografia). Quese analisi permettono la diagnosi di influenza in 10-30 minuti. Fra queste analisi, certe sono cosi' semplici che possono essere eseguite anche da persone che non hanno esperienza di laboratorio e di conseguenza possono essere eseguite ad esempio in una clinica, il che e' considerato come analisi sul posto.

Le reazioni RT-PCR che richiedono uno step di gel elettroforesi furono all'inizio lunghe da eseguire ma gli sviluppi relativamente recenti nelle tecnologie di real-time hanno fatto si' che la diagnosi con RT-PCR possa essere possibile entro due ore. Sebbene le analisi con antigene siano le piu' semplici da condurre, esse non sono cosi' sensibili come l'immunofluorescenza diretta, l'isolamento o la RT-PCR.

La Tavola 1 confronta le caratteristiche delle varie analisi disponibili per la diagnosi dell'influenza.

Tavola 1: Confronto fra le caratteristiche di diverse analisi *

Analisi	Sensi-bilita'	Tempo di esecuzione	Facilita' di esecuzione	Costo
Rilevamneto diretto				
Analisi rapide (EIA/cromatografia)	-2	+2	+2	0
Immunofluorescenza	0	+1	+1	+1
Gel elettroforesi RT-PCR	+2	0	-1	-2
Real-time RT-PCR	+2	+1	-1	-2
Colture virali				
Colture virali di routine	+2	-2	-1	+2
Colture shell vial	+1	0	-1	+1
Serologia				
EIA	+2	-2	+1	+1
Inibizione dell'emagglutinazione	+1	-2	-1	+2
Fissazione del complemento	0	-2	-2	+2

*Criteri relativi per la preferibilita' delle analisi (su una scala di 5 punti)
-2: carattetistiche molto sfavorevoli
-1: caratteristiche sfavorevoli
0: caratteristiche in media
+1: caratteristiche favorevoli
+2: carattetistiche molto favorevoli

Diagnosi differenziale di malattie simili all'influenza

Molti sintomi sono descritti come simili a quelli dell'influenza: febbre, tosse, congestione nasale, mal di testa, malessere, e mialgia. Tuttavia, non esiste una definizione chiara o uniformita' nell'uso del termine "simile all'influenza".

Durante un epidemia i sintomi clinici di febbre, tosse, sintomi nasali gravi e perdita di appetito, sono in gran parte indicatori di influenza. E' pero' possibile che molte altre infezioni presentino sintomi simili a quelli dell'influenza. Questi includono infezioni virali, batteriche, micoplasmiche, di clamidia e micotiche cosi' come infestazione con parassiti. Infezioni con pericolo mortale anche nelle persone giovani e sane, come febbre emorragica virale, o infezioni come legionella che comportano rischio per la vita di gruppi ad alto rischio come le persone anziane,

possono presentarsi inizialmente con sintomi simili all'influenza. E' quindi importante considerare una diagnosi differenziale ampia che tenga in considerazione la storia del paziente, e che include viaggi, esposizione da lavoro, contatto con animali e individui malati, storia dei sintomi cosi' come l'epidemiologia locale delle malattie.

Diagnosi di sospetta infezione umana con virus influenzale aviario

Introduzione

E' di importanza enorme la clarificazione rapida ed accurata di casi sospetti di infezione con H5N1 tramite diagnosi confermata in laboratorio in modo da poter iniziare e condurre un trattamento appropriato e le necessarie misure di controllo dell'infezione. L'isolamento del virus da campioni di casi sospetti di influenza aviaria dovrebbe essere eseguito da laboratori di referenza specializzati che possiedono come minimo locali con livello di sicurezza Biiosafety Level 3.

Raccolta dei campioni

Campioni per il rilevamento o l'isolamento del virus devono essere raccolti entro 3 giorni dall'inizio dei sintomi e devono essere trasportati rapidamente al laboratorio. Sono adatti per la diagnosi: aspirato nasofaringeo, tampone nasale, lavaggio nasale, tampone nasofaringeo o tampone della gola. Tuttavia, il campione migliore e' l'aspirato nasofaringeo. In casi in cui i pazienti sono intubati, e' possibilie raccogliere aspirati transtracheali e lavaggi broncoalveolari.

Allo stesso tempo si dovrebbero raccogliere campioni di siero da pazienti in fase acuta e convalescente per diagnosi serologica (WHO 2005b).

Modalita' diagnostiche virologiche

L'identificazione rapida dell'agente infettivo come virus A dell'influenza puo' essere eseguita tramite analisi rapida ordinaria che differenzia fra i tipi di influenza. Tuttavia, i metodi rapidi a cromatografia disponibili in commercio hanno una sensibilita' per l'influenza aviaria di solo il 70% quando confrontati alle colture (Yuen 2005). La diagnosi diretta di infezione con influenza H5N1 puo' venire eseguita tramite immunofluorescenza indiretta su cellule respiratorie fissate a vetrini usando una combinazione di: pool di anticorpi monoclonali specifici per influenza tipo A/H5, pool di anticorpi monoclonali specifici per influenza di tipo A e specifici per influenza di tipo B, cosi' come anticorpi monoclonali specifici contro influenza A/H1 e A/H3 (messi a disposizione dal WHO); il rivelamento avviene tramite antii-topo FITC. Questa analisi permette di distinguere rapidamente l'infezione umana con influenza H5 da infezione con altri tipi e sottotipi di influenza ma non puo' escludere l'infezione da H5N1 a causa della sua bassa sensibilita'. Di conseguenza e' consigliato di eseguire anche coltura e /o RT-PCR per aumentare la sensibilita'.

I virus possono essere isolati in uova di gallina embrionate, cellule di rene canino Madin Darby (MDKC) o in cellule di rene di scimmia Rhesus (LL-MK2) (de Jong

2005, Yuen 2005). Anche altre linee cellulari comuni come cellule Hep-2 o RD sono permissive all'infezione con virus influenzale aviario A/H5. Gli effetti citopatici non sono specifici e l'infezione virale delle cellule puo' essere rivelata via immunofluorescenza per la nucleoproteina. E' possibile sottotipizzare questi virus tramite HI con sopranatante dalle colture, immunofluorescenza specifica per H5 (usando anticorpi monoclonali anti H5) o RT-PCR (WHO 2005c). Sono anche disponibili primers H9 specifici (WHO 2005c).

Il rilevamento di influenza A/H5 tramite RT-PCR offre un metodo rapido e di elevata sensibilita' per la diagnosi di infezione H5N1 (Ng 2005).

Serologia: un aumento di quattro volte nel titolo di campioni da paziente in fase acuta a convalescente e' anche diagnostico in pazienti che hanno risolto l'infezione (Yuen 2005).

Altri risultati di laboratorio

Sono comunemente osservate in laboratorio leucopenia e specialmente linfopenia (che e' stata dimostrata come segno di prognosi non buona in Tailandia), trombocitopenia e livelli moderatamente elevati di transaminasi (Beigel 2005).

Nuovi sviluppi e il futuro della diagnostica per l'influenza

Sono state osservate certe tendenze nella diagnosi dell'influenza. La disponibilita' di farmaci antinfluenzali che devono essere somministrati precocemente durante l'infezione perche' siano effettivi, ha enfatizzato la necessita' di una diagnosi precoce e ha stimolato lo sviluppo di molti test rapidi EIA o immunocromotografici di bassa complessita' che permettano la diagnosi sul posto. Il valore di queste analisi e' pero' ancora limitato dalla loro bassa sensibilita' relativa, specialmente per la diagnosi di influenza aviaria.

La real time RT-PCR offre un'alternativa ad alta sensibilita' e specificita'. Gli sviluppi tecnologici in questo campo stanno facendo si' che la RT-PCR sia sempre piu' disponibile dal momento che gli strumenti stanno diventando di dimensioni piu' piccole, piu' efficenti e facili da usare. Per questo motivo la RT-PCR sta guadagnando sempre piu' prominenza nella preparazione per una pandemia influenzale dato che mettera' i laboratori in grado di condurre diagnosi specifiche ed ad alta sensibilita' dei casi umani di influenza aviaria. L'ultimo ostacolo che rimane e' il costo ancora relativamente elevato; ma un mercato altamente competitivo ha gia' reso questi test piu' a buon mercato.

Conclusioni

Le tecniche diagnostiche molecolari stanno avendo un ruolo sempre piu' prominente nella diagnosi dell'influenza in laboratorio. Anche le analisi rapide dirette stanno diventando uno strumento importante per investigare malattie simili all'influenza.

Le colture virali comunque restano importanti specialmente per i laboratori di referenza dal momento che sono a buon mercato, di elevata sensibilita' e permettono la caratterizzazione dei virus. In aggiunta, le colture virali, al contrario

delle analisi molecolari, non sono preferenziali e possono rivelare un ceppo nuovo al di fuori dalle aspettative.

Il maggior valore della serologia dell'influenza resta nelle investigazioni epidemiologiche dell'influenza annuale, della trasmissione dagli uccelli agli esseri umani e degli studi su farmaci e vaccini. Ha valore limitato per la diagnosi di routine.

Possiamo quindi concludere che la diagnosi virologica per l'influenza ha valore per i pazienti individuali, per le investigazioni epidemiologiche e per il controllo dell'infezione. La selezione appropriata di un'analisi particolare e' determinata dalle caratteristiche dell'analisi e dai bisogni specifici della diagnosi e della salute pubblica.

Un'analisi diagnostica positiva marca la differenza fra qualcuno con una malattia simile all'influenza e una diagnosi definitiva di influenza o fra un caso sospetto di influenza aviaria umana ed un caso confermato.

Indirizzi Internet utili in relazione alla diagnosi di influenza

http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5408a1.htm

http://www.fda.gov/cdrh/oivd/tips/rapidflu.html

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.pdf

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/print.html

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/avian_labtests2.pdf

http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf

Referenze

1. Allwinn R, Preiser W, Rabenau H, Buxbaum S, Sturmer M, Doerr HW. Laboratory diagnosis of influenza--virology or serology? Med Microbiol Immunol (Berl) 2002; 191: 157-60. Epub 2002 Aug 30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12458351
2. Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. http://amedeo.com/lit.php?id=16192482
3. Bigl S, Briem I, Drechsler R, Kluge D, Muller L, Nowotnik G. Acute respiratory diseases/influenza sentinel 2000/2001. Med Microbiol Immunol (Berl) 2002; 191: 151-6. Epub 2002 Sep 14. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12458350
4. Bishai FR, Galli R. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients. J Clin Microbiol 1978; 8: 648-56. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=217892

5. de Jong MD, Hien TT. Avian influenza A (H5N1). J Clin Virol 2005; Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16213784

6. FDA: Cautions in Using Rapid Tests for Detecting Influenza A Viruses. US Food and Drug Administration: Office of In Vitro Diagnostic Device Evaluation and Safety, 2005. (Accessed December 15 2005 at http://www.fda.gov/cdrh/oivd/tips/rapidflu.html

7. Frisbie B, Tang YW, Griffin M, et al. Surveillance of childhood influenza virus infection: what is the best diagnostic method to use for archival samples? J Clin Microbiol 2004; 42: 1181-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15004072

8. Julkunen I, Pyhala R, Hovi T. Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. J Virol Methods 1985; 10: 75-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3882733

9. Meerhoff TJ, Paget WJ, Aguilera JF, van der Velden J. Harmonising the virological surveillance of influenza in Europe: results of an 18-country survey. Virus Res 2004; 103: 31-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15163485

10. Ng EK, Cheng PK, Ng AY, Hoang TL, Lim WW. Influenza A H5N1 detection. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1303-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16102326

11. Prince HE, Leber AL. Comparison of complement fixation and hemagglutination inhibition assays for detecting antibody responses following influenza virus vaccination. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10: 481-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12738654

12. Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. J Clin Microbiol 2002; 40: 2051-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12037063

13. Stevens TD, Watkins HM. Rapid identification of viruses by indirect immunofluorescence: standardization and use of antiserum pool to nine respiratory viruses. Appl Microbiol 1969; 17: 384-93. http://amedeo.com/lit.php?id=4305395

14. Webster RG. Influenza: an emerging disease. Emerg Infect Dis 1998; 4: 436-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9716966

15. Weinberg A, Mettenbrink CJ, Ye D, Yang CF. Sensitivity of diagnostic tests for influenza varies with the circulating strains. J Clin Virol 2005; 33: 172-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15911434

16. WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. Geneva: World Health Organisation, 2005. (Accessed November 25, 2005, at http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.pdf)

17. WHO guidelines for the collection of human specimens for laboratory diagnosis of avian influenza infection. Geneva: World Health Organisation, 2005. (Accessed November 26, 2005 at http:/ /www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/print.html)

18. Recommended laboratory tests to indentify avian influenza A virus in specimens from humans. Genvea: World Health Organisation, 2005 (Accessed November 26, 2005 at http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/avian_labtests2.pdf)

19. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Geneva: World Health Organisation, 2005 (Accessed November 28, 2005 at http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf)

20. Yuen KY, Wong SS. Human infection by avian influenza A H5N1. Hong Kong Med J 2005; 11: 189-99. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15951584

21. Zambon M, Hays J, Webster A, Newman R, Keene O. Diagnosis of influenza in the community: relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza. Arch Intern Med 2001; 161: 2116-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11570941

Chapter 8: Presentazione Clinica

Christian Hoffmann and Bernd Sebastian Kamps

Influenza umana senza complicazioni

(Green links: Free full-text articles)

Dopo un periodo di incubazione breve di 1-2 (-4) giorni, l'inizio della malattia e' generalmente brusco con sintomi sistemici tipici: febbre alta con brividi, malessere severo, debolezza e fatica estrema, mal di testa o mialgia, possono anche essere presenti segni di malessere del sistema respiratorio come tosse non produttiva, mal di gola, e rinite (CDC 2005) (Tavole 1 e 2). Tra i bambini sono anche comuni otite media, nausea e vomito (Peltola 2003). In casi rari la presentazione clinica iniziale puo' essere atipica (convulsioni febbrili, Ryan-Poirier 1995; setticemia batterica, Dagan 1984).

Tavola 1. Sintomi tipici di influenza senza complicazioni
Inizio brusco
Sistemici: febbre, mal di testa, mialgia (nelle estremita', muscoli lunghi della schiena; muscoli oculari; nei bambini: muscoli del polpaccio), malessere, prostrazione.
Respiratori: tosse secca, produzione di muco nasale – puo' essere assente in anziani che invece possono presentare lassitudine e confusione.
Perdita della voce, mal di gola o gola secca appaiono spesso in concomitanza alla diminuzione di sintomi sistemici
Crup (solo nei bambini)

Tavola 2: Frequenza dei sintomi base *

Sintomo	(%)
Febbre≥ 37.8°C	68
Stato febbricitante**	90
Tosse	93
Congestione nasale	91
Debolezza	94
Perdita di appetito	92
Mal di gola	84
Mal di testa	91
Mialgia	94

*In 2,470 pazienti con influenza confermata in laboratorio (adattato da Monto 2000)
**Definita come la sensazione soggettiva del paziente ad avere febbre o brividi

La severita' della presentazione clinica varia da sintomi respiratori afebbrili, simili a quelli del comune raffreddore, a prostrazione severa senza segni e sintomi respiratori gravi, soprattutto negli anziani. La severita' dei sintomi e' correlata alla severita' della febbre.

La febbre e i sintomi sistemici hanno una durata tipica di 3 giorni, e solo occasionalmente durano fino a 4-8 giorni, e diminuiscono gradualmente; tosse e malessere, tuttavia, possono persistere per piu' di due settimane. Sono rari picchi febbrili secondari. I segni fisici sono riassunti nella Tavola 3. Il recupero totale puo' richiedere da 1 a 2 settimane, o puo' essere di durata maggiore, specialmente negli anziani.

Tavola 3. Segni fisici dell'influenza senza complicazioni

- Febbre: con picco rapido a 38-40°C (fino a 41°C, specialmente nei bambini), durata tipica 3 giorni (fino a 4-8 giorni), con diminuzione graduale; picchi febbrili secondari sono rari.
- Viso: arrossato
- Pelle: calda e umida
- Occhi: lacrimanti, arrossati
- Naso: gocciolante
- Orecchie: otitie
- Membrane mucose: iperemiche
- Linfonodi cervicali: presenti (specialmente nei bambini)

Gli adulti sono infettivi fino a 24 ore prima dell'inizio dei sintomi e fino a circa sette giorni successivamente. I bambini sono anche piu' contagiosi: bambini piccoli possono rilasciare il virus per parecchi giorni prima dell'inizio della malattia (Frank 1981) e possono essere infettivi per > 10 giorni (Frank 1981). Persone gravemente immunocompromesse possono rilasciare il virus influenzale per settimane o mesi (Klimov 1995, Boivin 2002).

Durante periodi non epidemici, i sintomi respiratori causati dall'influenza possono essere indistinguibili da sintomi causati da altri patogeni dell'apparato respiratorio (vedi Risultati di Laboratorio). Tuttavia, l'inizio brusco della malattia, febbre, malessere e debolezza sono caratteristicamente diversi dal raffreddore comune (Tavola 4).

Tavola 4. influenza o commune raffreddore?

Sintomi	Influenza	Raffreddore
Febbre	Generalmente alta, dura da 3 a 4 giorni	Unusuale
Mal di testa	Presente	Unusuale
Debolezza e/o prostrazione	Puo' durare 2-3 settimane	Leggera
Dolore	Usuale e generalmente severo	Leggero
Privazione di forze	All'inizio della malattia e severa	Mai
Naso otturato	Occasionalmente	Comune
Mal di gola	Occasionalmente	Comune
Tosse	Presente	Unusuale
Problemi al torace	Comuni e generalmente severi	Da leggeri a moderati
Complicazioni	Bronchite, polmonite: in casi severi con rischio di decesso	Congestione dei seni

Complicazioni dell'influenza umana

La complicazione piu' frequente dell'influenza e' la polmonite, con la polmonite secondaria di origine batterica come forma piu' comune, e la polmonite primaria influenzale come la piu' grave. In aggiunta, la polmonite mista batterica e virale e' presente frequentemente durante le epidemie.

L'influenza puo' peggiorare malattie cardiache o polmonari o altre malattie croniche. L'infezione con influenza e' stata anche associata a encefalopatia (McCullers 1999, Morishima 2002), mielite trasversale, miosite, miocardite, pericardite e sindrome di Reye.

Polmonite secondaria di origine batterica

La polmonite secondaria di origine batterica e' causata comunemente da *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus,* e *Haemophilus influenzae*. Tipicamente, i pazienti possono inizialmente recuperare dalla malattia acuta influenzale entro 2 o 3 giorni prima di presentare nuovamente temperature elevate. I sintomi e segni clinici sono consistenti con quelli della polmonite batterica classica: tosse, sputo purulento, e segni sia fisici che ai raggi X di consolidamento. L'eziologia puo' venire determinata tramite colorazione Gram e coltura di campioni di sputo. Le malattie croniche polmonari e cardiache predispongono alla polmonite secondaria di origine batterica, cosi' come l'eta' avanzata. La somministrazione di un appropriato regime di antibioitici e' usualmente sufficente per un trattamento efficace.

Polmonite virale primaria

Clinicamente, la polmonite virale primaria si presenta come un episodio di influenza acuto che non si risolve spontaneamente. La condizione clinica peggiora con febbre persistente, dispnea, e cianosi. Inizialmente, i risultati di un esame fisico del paziente possono essere giudicati non gravi. In casi piu' severi, uno sfogo diffuso puo' essere presente. A questo stadio risultati di un esame a raggi X mostra infiltrati interstiziali diffusi e sindrome di stress respiratorio acuta (ARDS) con ipossia marcata. Campioni di colture da secrezioni respiratorie o da tessuto polmonare presentano alto titolo virale.

La polmonite primaria da influenza con emorragie polmonari fu una caratteristica prominente della pandemia del 1918. In aggiunta, donne in gravidanza e individui con malattia cardiaca (stenosi mitrale) e malattie croniche polmonari ebbero un rischio maggiore durante la pandemia del 1957.

Polmonite mista virale e batterica

La polmonite influenzale mista presenta sia le caratteristiche cliniche della polmonite primaria che secondaria. Si presenta piu' frequentemente in pazienti con malattie croniche concomitanti polmonari o cardiache. Certi pazienti presentano un decorso lento e progressivo, altri possono mostrare un miglioramento transiente nella loro condizione, seguito da esacerbazione clinica. Il trattamento mira ad eradicare i patogeni di origine batterica coinvolti.

Esacerbazione della malattia cronica polmonare

I patogeni contagiosi sono stati da tempo riconosciuti come responsabili della patogenesi delle malattie croniche respiratorie (Monto 1978). In pazienti con bronchite cronica, l'infezione influenzale puo' portare ad una perdita permanente della funzione respiratoria. In bambini, asma indotta da influenza puo' deteriorare in maniera continua durante i primi due giorni della malattia e la convalescenza e' tipicamente piu' lunga (almeno sette giorni) (Kondo 1991). Il virus influenzale e' anche implicato nella patogenesi di attacchi d'asma negli adulti (Techtahl 1997)

Crup

La crup e' una complicazione tipica dell'infezione con influenza nei bambini. Il quadro clinico della crup causato da virus influenzali puo' essere piu' severo di quello causato da virus parainfluenzali (Peltola 2002).

Fallimento del recupero

Durante le epidemie influenzali, persone anziane compromesse in maniera grave sono considerate ad alto rischio. I tassi di polmonite e mortalita' variano fra meno di dieci a piu' di 600 in 100,000 fra adulti sani contro adulti con malattia cronica. In uno studio, il tasso di mortalita' piu' elevato (870 in 100,000) si verifico' in individui con malattia sia cardiovascolare che polmonare (Barker 1982). E' importante notare che il rischio di decesso puo' estendersi ben oltre le prime settimane dall'inizio delle compllicazioni dovute all'influenza. Certe persone semplicemente non si riprendono mai dalle complicazioni influenzali – e alla fine muoiono a causa del deterioramento delle funzioni polmonari, cardiovascolari e renali (Saah 1986).

Miosite

La miosite e' una complicazione rara dell'infezione con virus B dell'influenza, e in maniera minore dell'influenza A. E' stata riportata prevalentemente in bambini, con bambini maschi affetti piu' spesso delle bambine. L'intervallo medio fra l'inizio dell'influenza e l'inizio di miosite acuta benigna infantile e' di 3 giorni (Agyeman 2004). I muscoli del polpaccio sono interessati soli o insieme ad altri gruppi di muscoli nel 69% e nel 31% dei casi rispettivamente. La concentrazione ematica della creatinina fosfochinasi e' generalmente elevata (Hu 2004). I sintomi si risolvono normalmente entro 3 giorni e possono solo raramente persistere per un paio di settimane. Quando la miosite influenzale si presenta in pazienti anziani, e' importante essere in grado di distinguerla da altre forme di miopatie (Oba 2000).

Complicazioni cardiache

La miocardite e' un evento raro durante le infezioni influenzali. In una coorte non selezionata di pazienti con infezione influenzale acuta confermata sierologicamente (n=152), la prevalenza di livelli aumentati di creatinchinasi fu del 12%. Bisogna notare che i livelli di troponina cardiaca I e T non mostrarono aumento in nessuno dei pazienti. Gli autori conclusero che la prevalenza di miocardite durante infezione acuta con influenza e' sostanzialmente piu' bassa di quanto pensato in precedenza, mentre e' relativamente comune il danno ai muscoli scheletrici (Greaves 2003).

In uno studio mirato a determinare la frequenza, magnitudine, e durata della disfunzione miocardica in pazienti giovani precedentemente sani, elettrocardiogrammi anormali sono stati notati nel 53%, 33%, 27% e 23% dei pazienti nel giorno 1, 4, 11, e 28 rispettivamente, ma nessuno dei risulati venne considerato significativo da un punto di vista clinico. Nessun paziente mostro' cambi significativi nella frazione di emissione o movimenti abnormali della parete. Nessuno dei pazienti mostro' indice CK-MB o livelli di troponina I elevati (Ison 2005).

Sindrome da Toxic Shock

La syndrome da toxic shock (TSS) puo' accadere come complicazione dell'influenza (CDC 1986, MacDonald 1987, Tolan 1993). Uno dei segni indicatori della malattia e' lo sviluppo rapido, severo e a volte refrattario di ipotensione (Chesney 1981). La diagnosi di TSS viene fatta in base alla definizione di un caso clinico (Reingold 1981) ed e' frequente la possibilta' di dimostrare in campioni di sputo la presenza di *Staphylococcus aureus* produttore di tossine.

La diagnosi differenziale di shock improvviso in questo contesto clnico include la miocardite e lo shock settico. La differenziazione di queste malattie puo' essere difficie e richiede spesso il monitoraggio dell'emodinamica, analisi serologiche e culture da campioni clinici adeguati (CDC 1986).

Sindrome di Reye

La sindrome di Reye e' caratterizzata dalla combinazione di malattia epatica con encelfalopatia non infiammatoria. E' un'entita' non specifica clinicopatologica ed un termine descrittivo che comprende un gruppo di disturbi eterogenei. E' quasi sempre associata a infezioni virali occorse in precedenza, tipo influenza, raffreddore o varicella. La diagnosi differenziale include encefalite, meningite, diabete, overdose, avvelenamento o malattia psichiatrica.

Nell'influenza la sindrome di Reye e' una complicazione seria che puo' accadere nei bambini, in particolare in associazione con il virus B dell'influenza. Esiste una forte correlazione fra la somministrazione di aspirina e la sindrome di Reye (Starko 1980, Waldman 1982, Halpin 1983). Quando questa associazione venne riconoscuita, l'uso di salicilati in bambini ed adolescenti con infezioni virali acute dell'apparato respiratorio venne scoraggiato. Questo e' risultato in un marcato declino dell'incidenza della sindrome di Reye (Barrett 1986).

Nella prima epidemia di influenza aviaria fra esseri umani in Hong Kong nel 1997, un bambino mori' a causa di polmonite influenzale, sindrome da stress respiratorio acuto, sindrome di Reye, fallimento di numerosi organi, e coagulazione intravascolare disseminata (Claas 1998).

Complicazioni in pazienti infetti con HIV

La presentazione clinica dell'influenza in pazienti infetti con HIV non e' diversa da quella in altri gruppi di pazienti (Skiest 2001). Manifestazioni cliniche unusuali sono rare e il tasso di complicazioni polmonari e' simile a quello di pazienti negativi per HIV. Tuttavia, in un piccolo numero di campioni, e' stato riportato un tasso di ospitalizzazione maggore rispetto a quello visto comunemente in pazienti negativi

per HIV (Skiest 2001, Fine 2001). Solo la terapia HAART sembra in grado di ridurre il numero di ospitalizzazioni associate ad influenza (Neuzil 2003).

L'influenza puo' essere meno benigna in pazienti con AIDS, cioe' in uno stadio piu' avanzato di immunosoppressione. Negli Stati Uniti, l'influenza e' stata associata in questi pazienti con tassi di eccesso di mortalita' maggiori di quelli della poplazione generale e comparabili a quelli della popolazione generale di eta' uguale o superiore ai 65 anni (Lin 2001).

Infezioni di influenza aviaria negli esseri umani

Ceppi di virus dell'influenza aviaria sono stati identificati solo recentemente come causa di malattia umana. Nella maggioranza dei casi, le manifestazioni cliniche negli esseri umani sono lievi. Nel 1996, un vrus aviario H7 venne iisolato da una donna con congiuntivite (Kurtz 1996). Nel 1999, un ceppo **H9N2** venne isolato in Hong Kong da due bambini con lievi sintomi influenzali (Peiris 1999, Horimoto 2001). 4 anni dopo, in un'epidemia di un sottotipo altamente patogenico **H7N7** nei Paesi Bassi, in 89 persone infette la caratteristica prevalente fu congiuntivite; solo 7 individui mostrarono una malattia simile all'influenza che fu generalmente lieve. Tuttavia, un caso fatale di polmonite si verifico' in un uomo (Fouchier 2004): due giorni dopo aver visitato un allevamento di pollame affetto da influenza aviaria, un veterinario di 57 anni d'eta' sviluppo' malessere, mal di testa e febbre. Otto giorni dopo sviluppo' polmonite e successivamente le sue condizioni deteriorarono. Mori' quattro giorni dopo a causa di polmonite acuta.

L'unico ceppo di influenza aviaria che causa malattia severa ripetutamente negli esseri umani e' il serotipo **H5N1**, diagnosticato negli esseri umani per la prima volta in Hong Kong nel 1997 (CDC 1997, Yuen 1998). Fin'ora il numero di casi umani e' stato fortunatamente relativamente basso (152 fino al 23 gennaio 2006), ma la proporzione casi/tasso di mortalita' e' alta (83/152) (WHO 20051223). Le manifestazioni cliniche dell'infezione con influenza H5N1 negli esseri umani non sono ben definite dato che le conoscenze attuali sono limitate alla descrizione di pochi pazienti ospitalizzati. Lo spettro varia da infezioni asintomatiche (Katz 1999, Buxton Bridges 2000, Thorson 2006) a polmonite fatale e fallimento multiplo di organi.

Presentazione

I sintomi iniziali dell'influenza H5N1 possono includere febbre (tipicamente >38°C), mal di testa, malessere, mialgia, mal di gola, tosse e rinite (anche se sintomi dell'apparato respiratorio superiore possono essere assenti), manifestazioni gastrointestinali e congiuntivite (Yuen 1998, Chan 2002). Tutti questi sintomi non sono specifici e possono essere attribuiti ai sottotipi di virus influenzale umani correntemente in circolazione, H1N1 e H3N2. In due casi la caratteristica prominente fu diarrea (Hien 2004) associata a mancanza di fiato (Hien 2004, Chotpitayasunondh 2005). Diarrea liquida puo' essere presente ben prima che si sviluppino i sintomi polmonari (Apisarnthanarak 2004). Un'alto caso clinico descrisse un bambino di quattro anni con diarrea severa, seguita da convulsioni, coma e decesso, che suggeri' la diagnosi clinica di encefalite – l'influenza aviaria

H5N1 venne successivamente rivelata nel fluido cerebrospinale, in campioni di feci, gola e siero (de Jong 2005).

Analisi cliniche di pazienti con influenza aviaria H5N1 severa mostrano fra l'altro leucopenia, linfopenia, diminuita funzionalita' epatica con livelli elevati di enzimi epatici, tempi di coagulazione prolungati e disfunzionalita' renale. La conta dei linfociti sembra essere il parametro' piu' utile per l'identificazione di pazienti che sono a rischio di progressione verso malattia grave (Chan 2002).

Decorso clinico

Fino al dicembre 2005, circa la meta' dei pazienti diagnosticati con infezione clinica da influenza aviaria H5N1 sono deceduti. La maggior parte di questi pazienti mostrarono malattia severa al momento dell'ammissione in ospedale. In pazienti con fallimento del respiro che risulto' in un decesso, in un campione la dispnea si presento' dopo una media di 5 giorni (variazione da 1 a 6 giorni) (Chotpitayasunondh 2005). Radiografie toraciche abnormali includono infiltrazioni interstiziali, infiltrati lobulari a macchie con pattern variabile (lobo unico, lobi multipli, distribuzione unilaterale o bilaterale). Infine, il pattern radiografico progredisce fino ad un'apparenza diffusa bilaterale ground-glass con caratteristiche cliniche compatibili con ARDS (Chotpitayasunondh 2005). In un caso riportato dal Vietnam, maggiori abnormalita' nei raggi X includono infiltrazioni bilaterali estensive, collasso lobulare, consolidazione focale e air bronchograms. Tutti i pazienti presentarono un peggioramento drammatico dei risultati delle radiografie toraciche durante l'ospitalizzazione. Il tempo medio dall'inizio della febbre allo sviluppo di ARDS fu di 6 giorni (variazione 4-13 giorni) in un campione (Chotpitayasunondh 2005). Durante ventilazione meccanica e' possibile che si verifichi pneumotorace (Hien 2004). Efflusioni pleurali sono rare.

L'informazione esistente riguardo ai fattori di rischio associati con malattia grave e mortalita' e' conflittuale. Nell'epidemia del 1997 in Hong Kong, i fattori associati con malattia grave inclusero eta' avanzata, ritardo nell'ospitalizzazione, coinvolgimento del tratto respiratorio inferiore, e una conta piu' bassa dei leucociti totali periferici o linfopenia al momento dell'ammissione (Yuen 1998). In questa epidemia, i pazienti di eta' inferiore ai 6 anni mostrarono generalmente una malattia respiratoria acuta auto limitata con febbre, rinorrea e mal di gola. In contrasto, le infezioni recenti con influenza aviaria H5N1 hanno causato alti tassi di mortalita' fra lattanti e bambini piccoli (Chotpitayasunondh 2005). I numeri riportati sono troppo piccoli per chiarire se fattori locali – ad esempio il tempo lasciato passare fra l'inizio dei sintomi e l'ospitalizzazione – o fattori di virulenza del virus sono responsabili per queste differenze. Dal momento che i ceppi H5N1 sono evoluti durante gli ultimi 10 anni (Webster 2006), le caratteristiche cliniche dell'infezione umana da influenza aviaria potrebbero sicuramente mostrare caratteristiche diverse nel corso del tempo.

La progressione dell'infezione grave da H5N1 sembra essere diversa da quella delle malattie gravi osservate durante le pandemie di influenza precedenti. Nessuno dei pazienti con malattia grave in Hong Kong (Yuen 1998) e Vietnam (Yuen 1998) presentarono evidenza di polmonite secondaria di origine batterica, che suggerisce che la mortalita' risulto' da una polmonite virale insormontabile. Questa caratteristica ricorda la pandemia del 1918 e potrebbe essere patogeneticamente dovuta ad una "tempesta di citochine" (Barry 2004).

Referenze

1. Agyeman P, Duppenthaler A, Heininger U, Aebi C. Influenza-associated myositis in children. Infection 2004; 32: 199-203. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15293074

2. Apisarnthanarak A, Kitphati R, Thongphubeth K, et al. Atypical avian influenza (H5N1). Emerg Infect Dis 2004; 10: 1321-4. http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no7/04-0415.htm

3. Barker WH, Mullooly JP. Pneumonia and influenza deaths during epidemics: implications for prevention. Arch Intern Med 1982; 142: 85-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7053739

4. Barrett MJ, Hurwitz ES, Schonberger LB, Rogers MF. Changing epidemiology of Reye syndrome in the United States. Pediatrics 1986; 77: 598-602. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3960627

5. Barry JM. 1918 Revisited: Lessons and suggestions for further inquiry. In: The threat of pandemic influenza: are we ready? The National Academies Press, Washington, D.C., 2005. Free full-text at http://www.nap.edu/books/0309095042/html

6. Boivin G, Goyette N, Bernatchez H. Prolonged excretion of amantadine-resistant influenza a virus quasi species after cessation of antiviral therapy in an immunocompromised patient. Clin Infect Dis 2002; 34: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11807683

7. Buxton Bridges C, Katz JM, Seto WH, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. J Infect Dis 2000; 181: 344-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10608786 - Free full-text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v181n1/990819/990819.html

8. CDC 1986- Centers for Disease Control 1986. Toxic shock syndrome associated with influenza - Minnesota. MMWR 1986;35:143-4. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000695.htm

9. CDC 1997 - Centers for Disease Control. Isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from humans--Hong Kong, May-December 1997. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997; 46: 1204-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9414153 - Free full-text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00050459.htm

10. CDC 2005- Centers for Disease Control. Prevention and Control of Influenza Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2005; 54 (RR08): 1-40. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5408a1.htm

11. Chan PK. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. Clin Infect Dis 2002; 34: Suppl 2: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11938498 - Free full-text at http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v34nS2/010992/010992.html

12. Chesney PJ, Davis JP, Purdy WK, Wand PJ, Chesney RW. Clinical manifestations of toxic shock syndrome. JAMA 1981; 246: 741-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7253137

13. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual

severity of human disease? Lancet 2002; 360: 1831-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12480361

14. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. Emerg Infect Dis 2005; 11: 201-9. Free full-text at http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol11no02/04-1061.htm

15. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet 1998; 351: 472-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482438 - http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673697112120/fulltext

16. Dagan R, Hall CB. Influenza A virus infection imitating bacterial sepsis in early infancy. Pediatr Infect Dis 1984; 3: 218-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=6377255

17. de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, et al. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. N Engl J Med 2005; 352: 686-91. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15716562 - Free full-text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/7/686

18. Fine AD, Bridges CB, De Guzman AM, et al. Influenza A among patients with human immunodeficiency virus: an outbreak of infection at a residential facility in New York City. Clin Infect Dis 2001; 32: 1784-91. Epub 2001 May 16. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11360221

19. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 1356-61. http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/5/1356

20. Frank AL, Taber LH, Wells CR, Wells JM, Glezen WP, Paredes A. Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children. J Infect Dis 1981; 144: 433-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=6273473

21. Greaves K, Oxford JS, Price CP, Clarke GH, Crake T. The prevalence of myocarditis and skeletal muscle injury during acute viral infection in adults: measurement of cardiac troponins I and T in 152 patients with acute influenza infection. Arch Intern Med 2003; 163: 165-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12546606 - Free Free full-text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/full/163/2/165

22. Halpin TJ, Holtzhauer FJ, Campbell RJ, et al. Aspirin and ReyeŽs syndrome. JAMA 1983; 249: 3177. http://amedeo.com/lit.php?id=6854845

23. Hien TT, Liem NT, Dung NT, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N Engl J Med 2004; 350: 1179-88. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14985470 - Free full-text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/350/12/1179

24. Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 129-49. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11148006 - Free full-text at http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/1/129

25. Hu JJ, Kao CL, Lee PI, et al. Clinical features of influenza A and B in children and association with myositis. J Microbiol Immunol Infect 2004; 37: 95-8. http://www.jmii.org/content/abstracts/v37n2p95.php

26. Ison MG, Campbell V, Rembold C, Dent J, Hayden FG. Cardiac findings during uncomplicated acute influenza in ambulatory adults. Clin Infect Dis 2005; 40: 415-22. Epub 2005 Jan 10. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15668866 - Free full-text at http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v40n3/34270/34270.html

27. Katz JM, Lim W, Bridges CB, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. J Infect Dis 1999; 180: 1763-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10558929 - Free full-text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v180n6/990415/990415.html

28. Klimov AI, Rocha E, Hayden FG, Shult PA, Roumillat LF, Cox NJ. Prolonged shedding of amantadine-resistant influenzae A viruses by immunodeficient patients: detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. J Infect Dis 1995; 172: 1352-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7594676

29. Kondo S, Abe K. The effects of influenza virus infection on FEV1 in asthmatic children. The time-course study. Chest 1991; 100: 1235-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1935277

30. Kurtz J, Manvell RJ, Banks J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. Lancet 1996; 348: 901-2.

31. Lin JC, Nichol KL. Excess mortality due to pneumonia or influenza during influenza seasons among persons with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Intern Med 2001; 161: 441-6. Free full-text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/full/161/3/441

32. MacDonald KL, Osterholm MT, Hedberg CW, et al. Toxic shock syndrome. A newly recognized complication of influenza and influenzalike illness. JAMA 1987; 257: 1053-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3806893

33. McCullers JA, Facchini S, Chesney PJ, Webster RG. Influenza B virus encephalitis. Clin Infect Dis 1999; 28: 898-900. http://www.journals.uchicago.edu/cgi-bin/resolve?CIDv28p898PDF

34. Monto AS, Ross HW. The Tecumseh study of respiratory illness. X. Relation of acute infections to smoking, lung function and chronic symptoms. Am J Epidemiol 1978; 107: 57-64. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=623090

35. Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. Arch Intern Med 2000; 160: 3243-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11088084 - Free full-text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/full/160/21/3243

36. Morishima T, Togashi T, Yokota S, et al. Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan. Clin Infect Dis 2002; 35: 512-7. Free full-text at http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v35n5/011461/011461.html

37. Neuzil KM, Coffey CS, Mitchel EF Jr, Griffin MR. Cardiopulmonary hospitalizations during influenza season in adults and adolescents with advanced HIV infection. J Acquir Immune Defic Syndr 2003; 34: 304-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14600576

38. Oba K, Nishihara A, Okamura K, et al. Two cases of acute myositis associated with influenza A virus infection in the elderly. J Nippon Med Sch 2000; 67: 126-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10754602 - http://www.jstage.jst.go.jp/article/jnms/67/2/67_126/_article/-char/en

39. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, et al. Human infection with influenza H9N2. Lancet. 1999;354:916-7.

40. Peltola V, Heikkinen T, Ruuskanen O. Clinical courses of croup caused by influenza and parainfluenza viruses. Pediatr Infect Dis J 2002; 21: 76-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11791108

41. Reingold AL, Hargrett NT, Shands KN, et al. Toxic shock syndrome surveillance in the United States, 1980 to 1981. Ann Intern Med 1982; 96: 875-80. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7091960

42. Ryan-Poirier K. Influenza virus infection in children. Adv Pediatr Infect Dis 1995; 10: 125-56. http://amedeo.com/lit.php?id=7718204

43. Saah AJ, Neufeld R, Rodstein M, et al. Influenza vaccine and pneumonia mortality in a nursing home population. Arch Intern Med 1986; 146: 2353-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3778069

44. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. Nat Med 2002; 8: 950-4. Epub 2002 Aug 26. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12195436

45. Skiest DJ, Kaplan P, Machala T, Boney L, Luby J. Clinical manifestations of influenza in HIV-infected individuals. Int J STD AIDS 2001; 12: 646-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11564331

46. Skiest DJ, Machala T. Comparison of the effects of acute influenza infection and Influenza vaccination on HIV viral load and CD4 cell counts. J Clin Virol 2003; 26: 307-15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12637080

47. Starko KM, et al. ReyeŽs syndrome and salicylate use. Pediatrics, 1980;66:859-864. Free full-text at http://pediatrics.aappublications.org/cgi/content/full/102/1/S1/259

48. Teichtahl H, Buckmaster N, Pertnikovs E. The incidence of respiratory tract infection in adults requiring hospitalization for asthma. Chest 1997; 112: 591-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9315789 - Full text: http://www.chestjournal.org/cgi/reprint/112/3/591.pdf

49. Tolan RW Jr. Toxic shock syndrome complicating influenza A in a child: case report and review. Clin Infect Dis 1993; 17: 43-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8353244

50. Waldman RJ, Hall WN, McGee H, Van Amburg G. Aspirin as a risk factor in Reye‘s syndrome. JAMA 1982; 247: 3089-94. http://amedeo.com/lit.php?id=7077803

51. Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza. Emerg Infect Dis 2006; 12: 3-8. Free full-text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1024.htm

52. WHO 20051223. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. 23 December 2005. Accessed at http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2005_12_23/en/ind ex.html

53. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482437 - Free full-text at http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673698011829/fulltext

Chapter 9: Trattamento e profilassi

C. Hoffmann, S. Korsman and B.S. Kamps

Introduzione

- Green links: Free full-text articles -

La maggior parte dei pazienti con influenza senza complicazioni, specialmente adolescenti e giovani adulti, possono essere trattati sintomaticamente e non hanno bisogno di alcun trattamento specifico. Negli anziani, tuttavia, il trattamento con antivirali e' un'opzione da tenere in considerazione. Questi farmaci dovrebbero essere anche considerati per individui ad alto rischio, specialmente pazienti con altri problemi medici, cosi' come in altre situazioni speciali.

Gli inibitori delle neuraminidasi sono effettivi contro tutte le varianti che hanno causato malattia negli esseri umani, incluso il virus che ha causato la pandemia nel 1918 (Tumpey 2005). Per quanto riguarda l'influenza umana H5N1, il trattamento orale con un inibitore della neuraminidasi, oseltamivir, sembra essere effettivo in alcuni casi, ma puo' fallire in altri. Recentemente sono stati riportati casi di ceppi resistenti (de Jong 2005). Inoltre, il dosaggio e la durata del trattamento sembrano essere diversi in casi severi di infezione con H5N1.

Nel caso di una futura pandemia, i farmaci antivirali potrebbero avere un ruolo importante nella fase iniziale della malattia, quando il vaccino contro il nuovo ceppo non sara' ancora disponibile o finche' il vaccino sara' a disposizione limitata.

Farmaci antivirali

Al momento sono disponibili quattro farmaci antivirali per il trattamento dell'influenza A (due inibitori della neuraminidasi e due inibitori del canale ionico M2) e di questi solo gli inibitori della neuraminidasi oseltamivir e zanamivir sono anche attivi contro l'influenza B. Tutti i farmaci mostrano il massimo dell'efficacia se vengono somministrati entro poche ore dall'inizio dei sintomi e sono generalmente indicati per l'uso entro 48 ore dall'inizio dei primi sintomi. Questi farmaci possono modificare la severita' della malattia cosi' come ridurre l'intensita' dei sintomi dell'influenza e ridurre la durata della malattia da 1 a 3 giorni. Tuttavia, non si e' ancora raggiunto un consenso su quanto il trattamento con antivirali riduca complicazioni serie e ospitalizzazione. Il successo del trattamento dipende, in parte, dal lasso di tempo dall'inizio dei sintomi e l'inizio del trattamento: prima si inizia, meglio e'.

Gli inibitori della neuraminidasi, oseltamivir e zanamivir, hanno meno effetti collaterali degli inibitori del canale ionico M2 rimantidina e amantidina, e la resistenza ai farmaci sembra svilupparsi con minor frequenza. La farmacologia clinica, gli effetti collaterali e i profili di resistenza a questi farmaci sono discussi in dettaglio nel capitolo sui farmaci.

L'inibitore della neuraminidasi, oseltamivir (Tamiflu®), e' al momento il farmaco prescelto per il trattamento dell'influenza umana H5N1

Inibitori della neuraminidasi

Questi farmaci – introdotti nel 1999 e 2000 – interferiscono con le funzioni della neuraminidasi virale perche' imitano l'acido sialico, il substrato naturale della neuraminidasi (Varghese 1992, Varghese 1995). La neuraminidasi virale e' responsabile per la scissione dei resudui di acido sialico sui virioni di nuova formazione, e per questo motivo gioca un ruolo essenziale nel rilascio del virus e di conseguenza nel facilitare lo spargimento del virus nel tratto respiratorio. Quando vengono esposti agli inibitori della neuraminidasi, i virioni dell'influenza si aggregano sulla superficie della cellula ospite, questo limita l'infezione dei virioni nelle secrezioni mucosali (McNicholl 2001) e riduce l'infettivita' virale (vedi Figura in http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/13/1363/F1). Evidenza sperimentale suggerisce anche che la neuraminidasi influenzale potrebbe essere essenziale negli stadi iniziali dell'invasione virale dell'epitelio ciliato delle vie respiratorie (Matrosovich 2004).Gli inibitori della neuraminidasi sono stati disegnati sulla base delle analisi della struttura tridimensionale della neuraminidasi influenzale che hanno evidenziato la posizione e la struttura del sito catalitico (Colman 1983).

Numerosi studi sul **trattamento** di adulti giovani e sani hanno mostrato che gli inibitori della neuraminidasi, quando somministrati da 36 a 48 ore dall'inizio dei sintomi, diminuiscono i sintomi della malattia di uno o due giorni (Hayden 1997, Monto 1999, Treanor 2000, Nicholson 2000, Hedrick 2000, Cooper 2003, Whitley 2001, Aoki 2003). Un inizio precoce del trattamento e' decisivo per l'efficacia dello stesso (Aoki 2003, Kawai 2005). Quando vengono somministrati entro 12 ore dell'inizio della febbre, gli inibitori della neuraminidasi accorciarono la malattia per piu' di tre giorni, in confronto ad un trattamento che viene iniziato dopo 48 ore. E' stata mostrata anche una correlazione della la durata della febbre, della severita' dei sintomi, e del tempo necessario per il ritorno alle normali attivita' con il tempo di inizio dell'intervento antivirale.

Uno studio di istituti di cura a lungo termine canadesi mostrarono che i residenti piu' anziani delle case di cura a cui venne somministrato oseltamivir entro 48 ore dall'inizio dei sintomi richiesero meno prescrizioni di antibiotici, meno ospitalizzazione o furono a minor rischio di decesso (Bowles 2002). Gli effetti collaterali si mostrarono rari (4.1 %), e di questi i piu' comuni furono diarrea (1.6 %), tosse (0.7 %), confusione (0.5 %) e nausea (0.5 %). Un altro studio suggeri' che il trattamento della malattia influenzale con oseltamivir riduce le complicazioni del basso tratto respiratorio, l'uso di antibiotici, e l'ospitalizzazione in adulti sia sani che "a rischio" (Kaiser 2003).

Studi sulla **prevenzione** hanno mostrato che la somministrazione profilattica degli inibitori della neuraminidasi riducono il rischio di sviluppare influenza del 60-90 % quando questa avviene all'inizio dell'epidemia influenzale (Monto 1999b, Cooper 2003). Quando gli inibitori della neuraminidasi vengono somministrati profilatticamente a contatti domestici di un caso all'indice, l'efficacia protettiva contro influenza clinica fu generalmente > 80 % (Hayden 2000, Kaiser 2000, Welliver 2001, Monto 2002).

Gli inibitori della neuraminidasi sono generalmente ben tollerati. I maggiori **effetti avversi** dell'oseltamivir sono disturbi gastrointestinali (nausea, vomito) transienti. In particolare, il profilo di sicurezza osservato per oseltamivir e zanamivir mostra una comparazione favorevole con gli inibitori M2 rimantidina e amantidina (Freund 1999, Doucette 2001).

E' possibile che, raramente, si presentino serie reazioni e ipersensibilita' della pelle e i pazienti devono, conseguentemente, essere informati sulla necessita' di dover sospendere il trattamento con oseltamivir e di dover contattare il medico curante in caso di sviluppo di serio sfogo epidermico o di sintomi di allergia (FDA 2005). In seguito a trattamento con zanamivir, sono stati riportati in certi pazienti con concomitanti malattie polmonari come asma o malattia polmonare respiratoria ostruttiva cronica, broncospasmo e un declino nelle funzioni polmonari (FEV1 o picco di flusso espiratorio). Lo zanamivir, di conseguenza, non e' consigliato per il trattamento di pazienti con concomitante malattia delle vie respiratorie, e dovrebbe essere sospeso in pazienti che sviluppano broncospasmo o che mostrano un declino delle funzioni respiratorie (Relenza 2003).

Il potenziale per **interazioni** fra farmaci e' basso, sia per oseltamivir che per zanamivir. Con oseltamivir, si puo' verificare l'inibizione competitiva dell'escrezione da parte del trasportatore anionico delle cellule epiteliali tubulari renali. E' possibile che probenecid possa piu' che raddoppiare l'esposizione sistemica all'oseltamivir carbossilato (Hill 2002).

Si crede che non esistano ceppi virali naturalmente **resistenti** agli inibitori della neuraminidasi nell'influenza umana A (McKimm-Breschkin 2003). In vitro, le mutazioni NA E119V, R292K, H274Y, e R152K sono state associate con oseltamivir (McKimm-Breschkin 2003). Certe mutazioni, come le mutazioni R292K e H274Y, risultano in un enzima funzionale difettivo e in una compromessa fitness virale ed e' stato suggerito che virus portatori di queste mutazioni non dovrebbero causare conseguenze cliniche significative negli esseri umani (Tai 1998, Carr 2002, Ives 2002, Herlocher 2004). Tuttavia, e' stato recentemente riportato un ceppo resistente H5N1 portatore della mutazione H274Y che ha causato viremia in due pazienti che successivamente sono deceduti a causa di influenza aviaria (de Jong 2005). Lo zanamivir sembra ritenere attivita' *in vitro* contro certi ceppi resistenti all'oseltamivir (McKimm-Breschkin 2003, Mishin 2005).

Successivamente all'uso clinico, l'incidenza di sviluppo di ceppi resistenti e' minore tra gli adulti e gli adolescenti di eta' maggiore ai 13 anni che tra i bambini. Uno studio ha rilevato mutazioni della neuraminidasi in ceppi in 9/50 bambini (18 %) trattati con oseltamivir (Kiso 2004). Questi risultati devono essere presi in considerazione, dal momento che i bambini sono un vettore importante per la trasmissione dell'influenza nelle comunita'. In caso di una pandemia di H5N1, la frequenza di emergenza della resistenza durante il trattamento con oseltamivir di pazienti pediatrici H5N1 e' incerta, ma e' probabile che non sia minore di quella osservata in bambini infettati con i virus influenzali umani circolanti al momento (Hayden 2005).

Gli inibitori della neuraminidasi sono effettivi contro il virus che ha causato la pandemia del 1918 (Tumpey 2002).

Indicazioni per l'uso degli inibitori della neuraminidasi

L'oseltamivir (Tamiflu®) e lo zanamivir (Relenza®) sono al momento in commercio per il **trattamento** dell'influenza A e B. Dovrebbero essere usati solo quando i sintomi sono iniziati entro le 48 ore precedenti e dovrebbero essere iniziati idealmente entro 12 ore dall'inizio della malattia.

In aggiunta, l'oseltamivir – ma non lo zanamivir (con l'eccezione di due nazioni) – e' anche in commercio per la **profilassi** quando e' utilizzato entro 48 ore dall'esposizione all'influenza e quando l'influenza e' in circolazione nella comunita'; e' anche in commercio per l'uso in circostanze eccezionali (ad esempio quando la vaccinazione non copre il ceppo circolante) per prevenire un'epidemia influenzale.

Sembra che l'oseltamivir e lo zanamivir abbiano simile efficacia, ma ci sono differenze nella somministrazione e nella tolleranza. Lo zanamivir viene somministrato per inalazione ed e' ben tollerato; tuttavia i bambini, specialmente quelli al di sotto degli 8 anni di eta', hanno generalmente difficolta' ad usare il sistema di erogazione e persone anziane possono avere difficolta' equivalenti (Diggory 2001). L'oseltamivir e' somministrato sottoforma di una pillola ma puo' produrre nausea e vomito in certi pazienti

Inibitori del canale M2

L'amantidina e la rimantidina sono adamantanamine tricicliche simmetriche. Negli anni sessanta venne scoperto che hanno la capacita' di inibire ceppi dell'influenza (Stephenson 2001). Sono attive solo contro i virus A dell'influenza (l'influenza B non ha la proteina M2), hanno piu' effetti collaterali degli inibitori della neuraminidasi, e possono essere selettive per virus facilmente trasmissibili resistenti ai farmaci.

Gli inibitori M2 bloccano un canale ionico formato dalla proteina M2 che oltrepassa la membrana virale (Hay 1985, Sugrue 1991) e che e' necessaria per la rimozione della membrana di rivestimento virale (per ulteriori informazioni consultare il capitolo Farmaci). Entrambi i farmaci sono effettivi per il **trattamento** se esso viene iniziato entro 24 ore dall'inizio della malattia, e riducono la febbre e i sintomi di 1-2 giorni (Wingfield 1969, Smorodintsev 1970, van Voris 1981).

La **profilassi** giornaliera durante una stagione influenzale riduce il tasso di infezione del 50-90 % (Dawkins 1968, Dolin 1982, Clover 1986). La profilassi somministrata a persone che coabitano dopo l'esposizione rimane pero' problematica. In uno studio la rimantidina si dimostro' inefficente nella protezione contro infezione con influenza A di membri familiari (Hayden 1989).

I maggiori **effetti collaterali** associati con amantidina e rimantidina sono sintomi gastrointestinali. In aggiunta, l'amantidina ha un ampio reggio di tossicita' che puo' essere attribuito in parte agli effetti anticolinergici del farmaco. In aggiunta, fino a un terzo dei pazienti trattati per 5 giorni possono mostrare effetti collaterali minori reversibili nel sistema nervoso centrale (van Voris 1981). La stessa frequenza di effetti collaterali venne rilevata quando il farmaco venne esaminato in volontari giovani e sani in un periodo di quattro settimane. Su 44 individui, effetti collaterali (capogiri, irritibilita' e insonnia) si dimostrarono ben tollerati nella maggior parte dei soggetti, ma 6 volontari sospesero il trattamento con amantidina a causa di intolleranza notevole. Gli effetti collaterali sparirono in piu' della meta' dei soggetti

che continuarono l'amantidina. 16 volontari mostrarono una diminuita abilita' nell'esecuzione di attivita' che necessitavano attenzione continua (Bryson 1980). Gli effetti profilattici di amantidina e rimantidina risultarono equivalenti in uno studio di 450 volontari durante un'epidemia di influenza A. Malattia simile all'influenza si verifico' nel 14 % del gruppo rimantidina e nel 9 % del gruppo amantidina (Dolin 1982). Il ritiro dallo studio a causa di effetti collaterali nel sistema nervoso centrale si dimostro' maggiore nel gruppo amantidina (13 %) che nel gruppo rimantidina (6 %).

Il potenziale per **interazioni** con altri farmaci e' maggiore per l'amantidina, specialmente quando viene somministrata con stimolanti del sistema nervoso centrale. Agenti con proprieta' anticolinergiche potrebbero potenziare gli effetti collaterali di tipo anticolinergico dell'amantidina. Per maggiori dettagli vedere il capitolo Farmaci.

Mutazioni puntiformi nel gene M portano a cambi di aminoacidi nella regione transmembrana della proteina M2 e possono risultare in alot livello di **resistenza** all'amantidina. La resistenza genetica sembra sia basata su sostituzioni di singoli aminoacidi nelle posizioni 2, 27, 30, 31 o 34 nella porzione transmembrana del canale ionico M2 (Hay 1985). I mutanti sono virulenti e trasmissibili come il virus wild-type successivamente a sei passaggi in uccelli durante un periodo superiore ai 20 giorni. Ceppi di questo tipo hanno il potenziale di svilupparsi in un terzo dei pazienti trattati con amantidina o rimantidina; in individui immunocompromessi la percentuale potrebbe anche rivelarsi superiore (Englund 1998). Virus dell'influenza A (H3N2) resistenti ai farmaci puo' essere isolato da bambini e adulti trattati con rimantidina gia' 2 giorni dopo l'inizio del trattamento (Hayden 1991). Certi ceppi H5N1 che sono stati associati con malattia negli esseri umani nel sudest asiatico si sono rivelati resistenti all'amantidina e alla rimantidina (Peiris 2004, Le 2005), mentre ceppi isolati in circolazione in Indonesia e, recentemente, in Cina, Mongolia, Russia, Turchia e Romania sono sensibili all'amantidina (Hayden 2005).

Recentemente gli adamantani sono stati messi sotto inchiesta, dal momento che e' stato scoperto che il 91 % dei virus H3N2 dell'influenza A, isolati in pazienti negli Stati Uniti durante la stagione influenzale 2005-06, contenevano un cambio aminoacidico nella posizione 31 della proteina M2 che conferisce resistenza a rimantidina ed amantidina. Sulla base di questi risultati il CDC ha raccomandato che entrambe rimantidina ed amantidina non venissero usate per il trattamento o la profilassi dell'influenza A negli Stati Uniti per il resto della stagione influenzale 2005-06 (CDC 2006). Alcuni autori hanno suggerito che l'uso di amantidina e rimantidina dovrebbe essere generalmente scoraggiato (Jefferson 2006).

Indicazioni per l'uso di inibitori M2

Studi comparativi indicano che, in dosi equivalenti, la rimantidina e' meglio tollerata dell'amantidina (Stephenson 2001). Il vantaggio nell'uso dell'amantidina sta nel basso costo, 0.50 €/die in certe nazioni europee, in confronto a 5 €/die per la rimantidina e a 7 €/die per l'oseltamivir.

Trattamento dell'influenza umana "Classica"

In casi senza complicazioni, il trattamento migliore per la maggior parte degli adolescenti e di pazienti giovani adulti e' il riposo a letto con adeguata idratazione. Se necessario il trattamento con acido acetilsalicilico (0.6-0.9 g ogni 3-4 ore) puo'

essere preso in considerazione – mal di testa, febbre e mialgia di solito migliorano entro poche ore. Tuttavia l'uso dei salicilati in bambini di eta' inferiore ai 18 anni deve essre evitato a causa dell'associazione tra uso dei salicilati e sindrome di Reye. In questi casi acetaminophen e ibuprofen sono usati comunemente in alternativa.

L'ostruzione nasale puo' essere trattata con spray o gocce, e la tosse con vapori acquei. Soppressori della tosse sono necessari solo in un piccolo numero di pazienti. Dopo la regressione della febbre e' importante un ritorno graduale alle normali attivita'. Questo e' particolarmente importante per pazienti che hanno sofferto una forma particolarmente severa della malattia.

Il trattamento con antibiotici dovrebbe essere riservato per il trattamento di polmonite secondaria batterica. Idealmente la scelta del farmaco dovrebbe essere successiva a colorazione Gram e coltura di campioni isolati dall'apparato respiratorio. Nella pratica quotidiana, tuttavia, l'eziologia non puo' essere sempre determinata e il trattamento e' empirico e si basa sull'uso di farmaci antibatterici efficaci per il trattamento di patogeni che sono generalmente comuni in queste circostanze (i piu' importanti in questi casi sono *S. pneumoniae*, *S. aureus*, e *H. influenzae*).

Nei casi piu' severi, trattamento di supporto include controllo dei fluidi e degli elettroliti ed, eventualmente, supplemento di ossigeno, intubazione e ventilazione assistita.

Per un'informazione piu' dettagliata del trattamento dell'influenza umana H5N1, vedere in seguito

Trattamento antivirale

L'oseltamivir e' indicato per il trattamento della malattia acuta senza complicazioni dovuta ad influenza in pazienti di eta' uguale o superiore a 1 anno, che hanno mostrato sintomi per non piu' di due giorni. Si raccomanda che il trattamento con oseltamivir duri 5 giorni (ma potrebbe essere piu' lungo in infezioni severe con H5N1). Un trattamento con oseltamivir per 7 giorni e' anche indicato per la profilassi dell'influenza nella stessa fascia d'eta' (EU: ≥ 13 anni).

Lo zanamivir e' indicato per il trattamento di malattia acuta senza complicazioni dovuta ad infezione influenzale in pazienti di eta' uguale o maggiore di 7 anni che hanno mostrato sintomi per non piu' di due giorni. Con l'eccezione di due nazioni, lo zanamivir non e' stato approvato per uso profilattico. La durata del trattamento e' generalmente 5 giorni.

La rimantidina e l'amantidina non hanno effetto sul virus B dell'influenza e sono, di conseguenza, inddicate per la profilassi ed il trattamento della malattia causata solamente dal virus A dell'influenza. Per ridurre l'emergenza di virus resistenti ai farmaci antivirali, il trattamento con amantidina e rimantidina dovrebbe essere terminato appena possibile clinicamente, tipicamente dopo 3-5 giorni di trattamento o entro 24-48 ore dalla sparizione dei segnali e dei sintomi (CDC 2005).

Bisogna notare che negli US il CDC ha sospeso l'uso di sia amantidina che rimantidina per il trattamento o la profilassi di influenza A per tutta la stagione influenzale 2005-06 (CDC 2006).

Profilassi antivirale

Parecchi studi hanno dimostrato che gli inibitori della neuraminidasi sono efficaci nella prevenzione dell'influenza clinica in adulti sani in seguito all'esposizione con contatti intimi (Hayden 2000, Welliver 2001, Hayden 2004). Questi inibitori sono stati usati anche nella profilassi stagionale (Monto 1999, Hayden 1999). In tutti questi studi, gli inibitori della neuraminidasi sono effettivi per il 70-90 percento nella prevenzione dela malattia clinica causata da infezione con influenza A e B. Con l'eccezione di due nazioni, l'oseltamivir e' l'unico inibitore della neuraminidasi approvato per uso profilattico. Gli adamantani potrebbero essere considerati per la profilassi se il ceppo circolante e' influenza A.

Bisogna considerare i costi, la conformita' e i potenziali effetti collaterali quando si decide il momento e la durata della profilassi antivirale contro infezione influenzale. Per una profilassi stagionale effettiva, i farmaci dovrebbero essere somministrati per tutto il periodo di epidemia in una comunita', normalmente 6 settimane. Questo approccio potrebbe non essere particolarmente effettivo dal punto di vista dei costi, specialmente se si confronta con le vaccinazioni annuali (Patriarca 1989).

Durante una pandema, ci potrebbero essere anche meno opportunita' per la profilassi se il ceppo pandemico si rivelasse resistente agli inibitori M2 (cosi' come si rivelo' con certi serotipi del ceppo H5N1 circolante nel sudest asiatico nel 2004 e nel 2005), e se gli inibitori della neuraminidasi dovessero continuare ad essere poco disponibili. In questo caso, e' possibile che la maggior parte dei farmaci disponibili vengano riservati per il trattamento, e la profilassi potrebbe essere limitata a gruppi mirati con aumentato rischio di esposizione (personale sanitario, etc.).

Nell'influenza stagionale, la profilassi dovrebbe essere considerata nelle seguenti condizioni (adattato da CDC 2005):

- Persone ad alto rischio che sono vaccinate dopo l'inizio dell'attivita' influenzale

  Quando il vaccino antiinfluenzale e' somministrato mentre i virus influenzali sono in circolazione, la chemoprofilassi per due settimane dovrebbe essere presa in considerazione per persone ad alto rischio. Bambini di eta' < 9 anni, che ricevono il vaccino antinfluenzale per la prima volta, possono richiedere 6 settimane di profilassi (i.e., profilassi per 4 settimane dopo la prima dose di vaccino e 2 settimane addizionali di profilassi dopo la seconda dose).

- Persone che si prendono cura di persone ad alto rischio

  Il personale sanitario, se infetto con influenza puo' essere contagioso. Durante il picco di attivita' influenzale, la profilassi con farmaci antivirali puo' essere considerata per persone non vaccinate che hanno contatti frequenti con persone ad alto rischio. Persone con contatti frequenti includono persone impiegate in ospedale, cliniche, case di cura, membri famigliari, infermiere che provvedono cure a domicilio, e volontari. Se un'epidemia e' causata da un ceppo variante che potrebbe non essere controllato

dal vaccino, la chemoprofilassi dovrebbe essere considerata per tutte queste persone senza considerare lo stato di vaccinazione.

- Persone con deficienze del sistema immunitario

  La chemoprofilassi puo' essere presa in considerazione per persone ad alto rischio che potrebbero avere inadeguata risposta anticorpale al vaccino antinfluenzale. Questa categoria include persone infette con HIV, principalmente quelli con malattia avanzata causata da HIV.

- Altre persone

  E' possibile che la chemoprofilassi durante la stagione influenzale o durante il picco di attivita' influenzale possa essere indicata per persone ad alto rischio che non possono essere vaccinate.

- Istituzioni che ospitano persone ad alto rischio

  Esiste parecchia evidenza che la profilassi a livello istituzionale in case di riposo, somministrata appena viene rivelata attivita' influenzale, potrebbe essere un'aggiunta di valore nella strategia del controllo delle epidemie influenzali a livello istituzionale (Peters 2001, Bowles 2002, Monto 2004). La chemoprofilassi dovrebbe, di conseguenza, essere iniziata al piu' presto possible dopo la conferma o il sospetto di epidemie influenzali, dovrebbe essere somministrata a tutti i residenti compresi quelli che hanno ricevuto vaccinazione antinfluenzale durante la stagione precedente, ed essere continuata per almeno 2 settimane. Se la sorveglianza mostra nuovi casi, la chemoprofilassi dovrebbe continuare per circa 1 settimana dopo la fine dell'epidemia. Il dosaggio per ogni residente dovrebbe essere determinato individualmente. La chemoprofilassi puo' essere anche offerta al personale non vaccinato che si cura di persone ad alto rischio. La profilassi dovrebbe essere considerata per tutto il personale a prescindere dallo stato di vaccinazione, se l'epidemia influenzale e' causata da un ceppo di influenza che non corrisponde a quello usato per il vaccino.

Situazioni Particolari

Bambini

Oseltamivir: Bambini di eta' compresa fra 1 e 12 anni eliminano il metabolita attivo oseltamivir carbossilato a velocita' superiore rispetto a bambini di eta' superiore o adulti, il che risulta in esposizione minore. Un aumento della dose a 2 mg/kg due volte al giorno risulta in esposizione al farmaco comparabile alla dose di 1 mg/kg

due volte al giorno usata negli adulti (Oo 2001). I neonati fino ad un anno di eta' possono metabolizzare e secernere oseltamivir efficientemente (Oo 2003), ma in bambini piccoli, l'uso di oseltamivir e' controindicato (FDA 2005).

Zanamivir: Nell'Unione Europea, lo zanamivir e' approvato per l'uso in bambini di eta' uguale o superiore ai 12 anni (Stati Uniti: 7 anni).

Amantidina, rimantidina: Data l'efficacia relativamente bassa e l'alto rischio di sviluppo di effetti collaterali gastrointestinali e del SNC, gli autori non raccomandano la somministrazione di amantidina o rimantidina ai bambini.

Funzionalita' renale compromessa

Oseltamivir: in adulti sani la vita media di eliminazione plasmatica e' 1.8 ore. In pazienti con funzionalita' renale compromessa, la clearance del metabolita diminuisce linearmente con la clearance della creatinina e raggiunge una media di 23 h dopo somministrazione orale in pazienti con clearance della creatinina < 30 ml/min (Doucette 2001). Una riduzione del dosaggio a 75 mg una volta al giorno e' raccomandata per pazienti con una clearance della creatinina < 30 ml/min (1.8 l/h) (He 1999); nella profilassi si raccomanda un dosaggio di 75 mg ogni due giorni. Non viene raccomandato alcun dosaggio di trattamento o profilassi in pazienti sottoposti a dialisi.

Zanamivir: il produttore dichiara che non c'e' bisogno di aggiustare la dose durante un trattamento di 5 giorni per pazienti con funzionalita' renale compromessa leggera, moderata o severa (Relenza).

Rimantidina: l'insufficenza renale provoca aumento nella concentrazione plasmatica dei metaboliti della rimantidina. L'emodialisi non rimuove la rimantidina. Si raccomanda una riduzione a 100 mg/die in pazienti con clearance della creatinina < 10 ml/min. Dosi supplementari nei giorni di dialisi non sono richieste (Capparelli 1988). In pazienti con insufficenza renale meno severa, e in persone anziane, la rimantidina dovrebbe essere tenuta sotto controllo per quanto riguarda gli effetti collaterali.

Amantidina: si raccomanda una riduzione della dose per individui di eta' > 60 anni e con clearance della creatinina < 40 ml/min. Le raccomandazioni per il dosaggio dell'amantidina sulla base della clearance della creatinina si trovano nel foglietto illustrativo. In questi casi si raccomanda di considerare un'ulteriore riduzione della dose o sospensione del farmaco. L'amantidina non viene rimossa da emodialisi.

Funzionalita' epatica compromessa

Oseltamivir: il metabolismo dell'oseltamivir non e' compromesso in pazienti con funzionalita' epatica moderatamente compromessa, e in questo caso non sono richiesti aggiustamenti della dose (Snell 2005).

Zanamivir: non e' stato studiato in pazienti con funzionalita' epatica compromessa.

Rimantidina: per persone con funzionalita' epatica compromessa severa, si raccomanda una riduzione della dose della rimantidina.

Amantidina: reazioni avverse all'amantidina sono state osservate raramente in pazienti con malattia epatica.

Malattie convulsive

Sono state riportate convulsioni (o attivita' simile a convulsioni) durante il trattamento con amantidina o rimantidina in pazienti che hanno presentato convulsioni nel passato ma al momento non in terapia anticonvulisiva.

Gravidanza

Tutti i farmaci sopramenzionati dovrebbero essere usati durante la gravidanza se il beneficio potenziale giustifica il rischio potenziale per il feto (Categoria di gravidanza C).

Trattamento dell'influenza umana H5N1

L'esperienza nel trattamento della malattia da H5N1 e' limitata – fino all' 8 marzo 2006 (WHO 2006), 175 casi confermati sono stati riportati al WHO e fino ad oggi sono stati pubblicati solo pochi resoconti di casi clinici (Yuen 1998, Chan 2002, Hien 2004, Chotpitayasunondh 2005, WHO 2005, de Jong 2005).

Sulla base dei dati correntemente a disposizione, il trattamento della malattia influenzale causata dai ceppi H5N1 circolanti al momento sembra essere in qualche modo differente dal trattamento dell'influenza "classica". Tuttavia, bisogna notare ce le raccomandazioni correnti sono preliminari ed e' possibile che subiscano modificazioni nel corso dell'acquisizione di nuovi dati:

- Pazienti con sospetta influenza H5N1 dovrebbero ricevere tempestivamente un inibitore della neuraminidasi in attesa dei risultati del laboratorio (WHO 2005).
- L'oseltamivir (Tamiflu®) e' al momento considerato come il farmaco di preferenza.
- Il dosaggio dell'oseltamivir potrebbe dover essere aumentato in malattia severa fino a 150 mg due volte al giorno negli adulti.
- In casi severi, potrebbe essere necessario somministrare l'oseltamivir per periodi piu' lunghi (7-10 giorni o piu') sia per il trattamento che per la profilassi (WHO 2005).
- Resistenza puo' accadere durante o precedere il deterioramento clinico (de Jong 2005).
- Il trattamento con oseltamivir potrebbe risultare benefico anche quando iniziato fino a 8 giorni dopo l'inizio dei sintomi, se c'e' evidenza di replicazione virale in corso (WHO 2005, de Jong 2005).

I corticosteroidi sono stati usati frequentemente, con risultati conflittuali. In una serie, sei su sette pazienti trattati con corticosteroidi sono deceduti (Hien 2004). Ribavirin, interferone alfa e altri farmaci immunomodulatori sono stati usati, ma senza risultati convincenti.

In casi severi e' possibile che entro pochi giorni dal ricovero siano necessari supporto ventilatorio e terapia intensiva (Hien 2004, Chotpitayasunondh 2005).

Profilassi della trasmissione

Appena si sospetta un caso di infezione umana con H5N1, e' necesssario prendere precauzioni per minimizzare il contagio nosocomiale. Se la diagnosi e' confermata, i possibili contatti del caso all'indice devono essere identificati per facilitare un intervento rapido con terapia antivirale, in modo da ridurre la morbidita' e la mortalita' e per limitare ulteriore contagio (WHO 2004).

Misure generali di controllo dell'infezione

Misure di controllo dell'infezione includono l'applicazione di precauzioni standard (Garner 1996) per tutti i pazienti ricoverati in ospedale. Se la diagnosi di influenza H5N1 viene considerata sulla base di caratteristiche cliniche, precauzioni addizionali dovrebbero essere implementate fino al momento in cui la diagnosi puo' essere scartata.

Misure eccezionali di controllo dell'infezione

Il virus dell'influenza viene trasmesso da goccioline e piccoli nuclei di gocce (trasportati nell'aria). In aggiunta, e' possibile anche la trasmissione per contatto diretto ed indiretto. Nonostante non ci sia al momento evidenza di trasmissione di H5N1 tra gli esseri umani, il WHO raccomanda le seguenti precauzioni (WHO 2004):

- Uso di maschere ad alta efficienza in aggiunta a precauzioni che eliminano contatto con persone infette e gocce.
- I pazienti dovrebbero essere tenuti in una stanza con pressione negativa.
- I pazienti dovrebbero essere mantenuti in isolamento in camera singola. Se non ci sono a disposizione camere singole, i pazienti devono essere mantenuti in camere con piu' letti separate o in reparti separati.
- E' necessario mantenere tra i letti dei pazienti 1 metro di distanza e preferibilmente una barriera fisica (tende, separe').

Per proteggere il personale sanitario e altro personale ospedaliero, bisogna osservare le seguenti raccomandazioni (WHO 2004):

- Il personale sanitario deve autoproteggersi con maschere ad alta efficienza HCWs (respiratori approvati dalla commissione europea o con certificato US NIOSH N-95), camice, scudo protettivo per il viso o occhiali di protezione, e guanti. L'uso di maschere per il personale sanitario in condizioni di pandemia e' stato clarificato di recente (WHO 2005b). Una maschera chirurgica, quando viene usata continuamente puo' ridurre il rischio di infezione, ma non in maniera significativa (Loeb 2004).
- Limitare il numero di personale sanitario che ha contatto diretto con i pazienti e non lasciare che lo stesso personale si curi di altri pazienti.

- Il numero di altro personale ospedaliero (personale addetto alle pulizie, personale di laboratorio) con accesso agli ambienti in cui i pazienti sono ospitati dove essere limitato.

- Il personale sanitario designato dovrebbe essere preparato in maniera appropriata nell'uso delle precauzioni per il controllo dell'infezione. Limitare il numero delle visite e provvedere i visitatori con equipaggiamento di protezione personale e istruzioni per l'uso di tale equipaggiamento.

- Chiedere al personale sanitario con contatto diretto con i pazienti di controllare la propria temperatura e di riportare alle autorita' ospidaliere qualsiasi evento febbrile. Personale sanitario con febbre > 38ºC, e che ha avuto contatto diretto con i pazienti, deve essere trattato immediatamente.

- Offrire profilassi post-esposizione (per esempio, oseltamivir 75 mg al giorno oralmente per 7 giorni) per ogni personale sanitario che ha avuto contatto potenziale con gocce di areosol di un paziente senza aver avuto equipaggiamento protettivo personale adeguato.

- Personale sanitario indiposto non dovrebbe essere coinvolto direttamente nella cura dei pazienti dal momento che sono piu' vulnerabili e potrebbero essere piu' proni a sviluppare malattia severa in caso di esposizione con virus dell'influenza A H5N1.

- Eliminare i rifiuti adeguatamente mettendoli in sacchi impereabili chiusi che devono essere chiaramente identificati "Biohazard" e incenerati. Lenzuola e materiale riusabile che sono stati in contatto con pazienti devono essere maneggiati separatamente e disinfettati.

Rintracciameto dei contatti

E' necessario identificare i contatti cosi' come le persone che potrebbero essere state esposte ad una fonte comune di infezione. Sono considerati contatti le persone che hanno condiviso luoghi particolari (abitazione, familiari, ospedale o altre istituzioni residenziali, baracche militari o campeggi ricreazionali) con una persona in cui la diagnosi di influenza A (H5N1) e' in considerazione,durante il periodo in cui questa persona era infettiva (da 1 giorno prima dell'inizio dei sintomi fino a 7 giorni dopo l'inizio dei sintomi, o fino alla data prescritta dalle autorita' sanitarie nazionali, o fino alla data indicata nella sezione "Politiche per il rilascio") (WHO 2004).

Queste persone dovrebbero essere controllate per 7 giorni successivamente all'ultima esposizione con il paziente implicato, o con la fonte comune, e la loro temperatura dovrebbe essere controllata due volte al giorno. Se una delle persone sotto sorveglianza sviluppano febbre (> 38ºC) e tosse o mancanza di respiro, deve essere trattata immediatamente (WHO 2004).

Politiche per il rilascio

Il WHO raccomanda che le precauzioni per il controllo dell'infezione per pazienti adulti rimangano in azione per 7 giorni dopo la risoluzione della febbre. Studi precedenti dell'influenza umana hanno indicato che bambini di eta' inferiore ai 12 anni possono rilasciare virus per 21 giorni dopo l'inizio della malattia. Di conseguenza, le misure di controllo dell'infezione per i bambini dovrebbero idealmente rimanere in azione per questo periodo di tempo (WHO 2004).

In caso questo non fosse possibile (a causa di mancanza di risorse locali), la famiglia dovrebbe essere educata nell'igiene personale e nelle misure di controllo dell'infezione (ad esempio lavare le mani e usare una maschera di carta o chirurgica nelle vicinanze di un bambino che ha ancora tosse). I bambini non dovrebbero andare a scuola durante questo periodo (WHO 2004).

Profilassi globale di una pandemia

Esiste una certa evidenza che il contenimento e l'eliminazione di un ceppo pandemico influenzale alla fonte e' possibile mediante l'uso di una combinazione di profilassi antivirale e di misure di distanza sociale (Ferguson 2005). Usando un modello di simulazione di trasmissione dell'influenza nel sud est asiatico per valutare il potenziale effettivo di un uso profilattico mirato di massa di farmaci antivirali, gli autori hanno previsto che una scorta di 3 milioni di dosi potrebbe essere sufficiente per l'eliminazione.

Il WHO ha iniziato recentemente la creazione di una scorta internazionale di farmaci antivirali per la spedizione alla regione in cui la pandemia influenzale emergera' (WHO 20000824). Se la pandmia non puo' essere contenuta alla fonte, un intervento rapido potrebbe se non altro rimandare il contagio internazionale e fornire tempo prezioso. Perche' questa strategia funzioni, deve essere presente un numero di criteri chiave che permettono un'alta probabilita' di successo (Ferguson 2005):

1. identificazione rapida del gruppo di casi originale,
2. identificazione rapida e accurata dei casi e distribuzione del trattamento a gruppi mirati, preferibilmente entro 48 ore dall'emergenza di un caso,
3. distribuzione effettiva del trattamento ad un'alta proporzione della popolazione mirata, preferibilmente > 90 %,
4. scorte sufficienti di farmaci preferibilmente 3 milioni o piu' di dosi di oseltamivir (il WHO ha al momento questa scorta a disposizione),
5. cooperazione della popolazione con la strategia di contenimento e, in particolare, con le misure di distanza sociale introdotte,
6. cooperazione internazionale nelle politiche di sviluppo, di sorveglianza dell'epidemia e di implementazione delle strategie di controllo.

Bisogna notare che l'idea di fermare una pandemia alla fonte o di ritardarne il contagio internazionale e' un'ipotesi attraente, ma al momento non ancora provata. Fino ad ora, non e' mai stato tentato di alterare il corso naturale di una pandemia

una volta emersa nella popolazione umana. Le complicazioni logistiche nella distribuzione dei farmaci ad una popolazione di grandi dimensioni sono considerevoli. In aggiunta, il primo ceppo pandemico virale non dovrebbe essere altamente contagioso, e il virus dovrebbe essere limitato ad un'area geografica limitata. Ci sono molti "se", e il risultato non e' per niente certo. Ciononostante, date le potenziali conseguenze catastrofiche di una pandemia influenzale, la strategia del WHO di mettere in scorta farmaci antivirali per un intervento rapido e precoce e' solo uno dei numerosi e preziosi elementi della pianificazione dei preparativi per affrontare globalmente una pandemia.

Conclusione

L'introduzione degli inibitori della neuraminidasi si e' rivelato un passo importante per un controllo piu' efficiente dell'infezione influenzale umana. Oggi, gli inibitori della neuraminidasi sono gli unici farmaci effettivi contro isolati virali di influenza aviaria altamente patogenica negli esseri umani. Tuttavia, la riportata resistenza elevata ai farmaci di ceppi H5N1 ricorda l'esperienza che abbiamo avuto con altre infezioni virali come HIV: non abbiamo mai farmaci sufficenti per il trattamento dei pazienti e siamo sempre in bisogno di farmaci migliori e nuovi. Abbiamo di fronte a noi la prospettiva di grandi sforzi nel tentativo di sviluppare altri farmaci e perfino supervaccini che includono antigeni persenti in tutti i sottotipi di virus influenzale, che non cambiano di anno in anno, e che possono essere messi a disposizione di tutta la popolazione mondiale (Osterholm 2005). Questi sforzi saranno costosi, ma solo in termini monetari: niente in confronto alla perdita di vite associate con la prossima pandemia influenzale.

Referenze

1. Air GM, Laver WG. The neuraminidase of influenza virus. Proteins 1989; 6: 341-56. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2482974

2. Aoki FY, Macleod MD, Paggiaro P, et al. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 123-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12493796 - Full text at http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/full/51/1/123

3. Bean WJ, Threlkeld SC, Webster RG. Biologic potential of amantadine-resistant influenza A virus in an avian model. J Infect Dis 1989; 159: 1050-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2723453

4. Bowles SK, Lee W, Simor AE, et al. Use of oseltamivir during influenza outbreaks in Ontario nursing homes, 1999-2000. J Am Geriatr Soc 2002; 50: 608-16. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11982659

5. Bryson YJ, Monahan C, Pollack M, Shields WD. A prospective double-blind study of side effects associated with the administration of amantadine for influenza A virus prophylaxis. J Infect Dis 1980; 141: 543-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7373087

6. Butler D. Wartime tactic doubles power of scarce bird-flu drug. Nature 2005; 438: 6. http://amedeo.com/lit.php?id=16267514

7. Capparelli EV, Stevens RC, Chow MS, Izard M, Wills RJ. Rimantadine pharmacokinetics in healthy subjects and patients with end-stage renal failure. Clin Pharmacol Ther 1988; 43: 536-41. http://amedeo.com/lit.php?id=3365917

8. Carr J, Ives J, Kelly L, et al. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. Antiviral Res 2002; 54: 79-88. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12062393

9. CDC 1999 - Centers for Disease Control. Neuraminidase inhibitors for treatment of influenza A and B infections. MMWR Recomm Rep 1999; 48: 1-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10632443 - Full text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr4814a1.htm

10. CDC 2005 - Centers for Disease Control. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2005; 54: 1-40. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16086456 - Full text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5408a1.htm

11. CDC 2006. CDC Recommends against the Use of Amantadine and Rimantadine for the Treatment or Prophylaxis of Influenza in the United States during the 2005-06 Influenza Season. Available from http://www.cdc.gov/flu/han011406.htm - Accessed 13 February 2006.

12. Chan PK. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. Clin Infect Dis 2002; 34: Suppl 2: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11938498 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v34nS2/010992/010992.html

13. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. Emerg Infect Dis 2005; 11: 201-9. Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol11no02/04-1061.htm

14. Clover RD, Crawford SA, Abell TD, Ramsey CN Jr, Glezen WP, Couch RB. Effectiveness of rimantadine prophylaxis of children within families. Am J Dis Child 1986; 140: 706-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3521258

15. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. Nature 1983; 303: 41-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=6188957

16. Cooper NJ, Sutton AJ, Abrams KR, Wailoo A, Turner D, Nicholson KG. Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of influenza A and B: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. BMJ 2003; 326: 1235. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12791735 - Full text at http://bmj.bmjjournals.com/cgi/content/full/326/7401/1235

17. Dawkins AT Jr, Gallager LR, Togo Y, Hornick RB, Harris BA. Studies on induced influenza in man. II. Double-blind study designed to assess the prophylactic efficacy of an analogue of amantadine hydrochloride. JAMA 1968; 203: 1095-9. http://amedeo.com/lit.php?id=4870515

18. de Jong MD, Tran TT, Truong HK, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. N Engl J Med 2005; 353: 2667-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16371632 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2667

19. Demicheli V, Jefferson T, Rivetti D, Deeks J. Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. Vaccine 2000; 18: 957-1030. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10590322

20. Diggory P, Fernandez C, Humphrey A, Jones V, Murphy M. Comparison of elderly people's technique in using two dry powder inhalers to deliver zanamivir: randomised controlled trial. BMJ 2001; 322: 577-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11238150 - Full text at http://bmj.bmjjournals.com/cgi/content/full/322/7286/577

21. Dolin R, Reichman RC, Madore HP, Maynard R, Linton PN, Webber-Jones J. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. N Engl J Med 1982; 307: 580-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7050702

22. Doucette KE, Aoki FY. Oseltamivir: a clinical and pharmacological perspective. Expert Opin Pharmacother 2001; 2: 1671-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11825310

23. Englund JA, Champlin RE, Wyde PR, et al. Common emergence of amantadine- and rimantadine-resistant influenza A viruses in symptomatic immunocompromised adults. Clin Infect Dis 1998; 26: 1418-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9636873 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/cgi-bin/resolve?CIDv26p1418PDF

24. FDA - Food & Drug Administration. FDA Approves Tamiflu for Prevention of Influenza in Children Under Age 12. Accessed on 8 January 2006 from http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2005/NEW01285.html

25. Ferguson NM, Cummings DA, Cauchemez S, et al. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. Nature 2005; 437: 209-14. Epub 2005 Aug 3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16079797

26. Freund B, Gravenstein S, Elliott M, Miller I. Zanamivir: a review of clinical safety. Drug Saf 1999; 21: 267-81. http://amedeo.com/lit.php?id=10514019

27. Garner JS, and the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. Part II. Recommendations for isolation precautions in hospitals. Am J Infect Control 1996; 24: 32-52. Full text at at http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation_ptII.html

28. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. EMBO J 1985; 4: 3021-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=4065098 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=4065098

29. Hayden FG, Belshe RB, Clover RD, Hay AJ, Oakes MG, Soo W. Emergence and apparent transmission of rimantadine-resistant influenza A virus in families. N Engl J Med 1989; 321: 1696-702. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2687687

30. Hayden FG, Sperber SJ, Belshe RB, Clover RD, Hay AJ, Pyke S. Recovery of drug-resistant influenza A virus during therapeutic use of rimantadine. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1741-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1952841 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=1952841

31. Hayden FG, Osterhaus AD, Treanor JJ, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenzavirus infections. N Engl J Med 1997; 337: 874-80. http://amedeo.com/lit.php?id=9302301 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/337/13/874

32. Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, et al. Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. N Engl J Med 1999; 341: 1336-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10536125 - Full text http://content.nejm.org/cgi/content/full/341/18/1336

33. Hayden FG, Gubareva LV, Monto AS, et al. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. Zanamivir Family Study Group. N Engl J Med 2000; 343: 1282-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11058672 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/343/18/1282

34. Hayden FG. Perspectives on antiviral use during pandemic influenza. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2001; 356: 1877-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11779387 - Full text at http://www.influenzareport.com/link.php?id=11

35. Hayden FG, Belshe R, Villanueva C, et al. Management of influenza in households: a prospective, randomized comparison of oseltamivir treatment with or without postexposure prophylaxis. J Infect Dis 2004; 189: 440-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14745701 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v189n3/31422/31422.html

36. Hayden F, Klimov A, Tashiro M, et al. Neuraminidase inhibitor susceptibility network position statement: antiviral resistance in influenza A/H5N1 viruses. Antivir Ther 2005; 10: 873-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16430192

37. Hedrick JA, Barzilai A, Behre U, et al. Zanamivir for treatment of symptomatic influenza A and B infection in children five to twelve years of age: a randomized controlled trial. Pediatr Infect Dis J 2000; 19: 410-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10819336

38. Herlocher ML, Truscon R, Elias S, et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. J Infect Dis 2004; 190: 1627-30. Epub 2004 Sep 28. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15478068 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/abstract/45/4/1216

39. Holsinger LJ, Nichani D, Pinto LH, Lamb RA. Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. J Virol 1994; 68: 1551-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7508997 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=7508997

40. Ives JA, Carr JA, Mendel DB, et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. Antiviral Res 2002; 55: 307-17. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12103431

41. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. Lancet 2006; 367: 303-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16443037

42. Kaiser L, Wat C, Mills T, Mahoney P, Ward P, Hayden F. Impact of oseltamivir treatment on influenza-related lower respiratory tract complications and hospitalizations. Arch Intern Med 2003; 163: 1667-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12885681 - Full text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/abstract/163/14/1667

43. Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, et al. Factors influencing the effectiveness of oseltamivir and amantadine for the treatment of influenza: a multicenter study from Japan of the 2002-2003 influenza season. Clin Infect Dis 2005; 40: 1309-16. Epub 2005 Mar 16. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15825034

44. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet 2004; 364: 759-65. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15337401

45. Leneva IA, Goloubeva O, Fenton RJ, Tisdale M, Webster RG. Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes encoding H5N1 internal

proteins and are pathogenic in mammals. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1216-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11257037 - Full text at

46. Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature 2004; 430: 209-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15241415

47. Le QM, Kiso M, Someya K, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. Nature 2005; 437: 1108. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16228009

48. Loeb M, McGeer A, Henry B, et al. SARS among critical care nurses, Toronto. Emerg Infect Dis 2004; 10: 251-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15030692 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no2/03-0838.htm

49. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. J Virol 2004; 78: 12665-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15507653 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/22/12665

50. McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2264-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12821478 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/abstract/47/7/2264

51. McNicholl IR, McNicholl JJ. Neuraminidase inhibitors: zanamivir and oseltamivir. Ann Pharmacother 2001; 35: 57-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11197587

52. Mishin VP, Hayden FG, Gubareva LV. Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4515-20. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16251290 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16251290

53. Moscona A. Oseltamivir resistance - disabling our influenza defenses. N Engl J Med 2005; 353: 2633-6. http://amedeo.com/lit.php?id=16371626 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2633 - Audio at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2633/DC1

54. Monto AS, Fleming DM, Henry D, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B virus infections. J Infect Dis 1999; 180: 254-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10395837 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v180n2/990003/990003.html

55. Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. Arch Intern Med 2000; 160: 3243-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11088084 - Full text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/reprint/160/21/3243

56. Monto AS, Robinson DP, Herlocher ML, Hinson JM Jr, Elliott MJ, Crisp A. Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. JAMA 1999; 282: 31-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10404908 - Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/282/1/31

57. Monto AS, Rotthoff J, Teich E, et al. Detection and control of influenza outbreaks in well-vaccinated nursing home populations. Clin Infect Dis 2004; 39: 459-64. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15356805 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v39n4/33140/33140.html

58. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. N Engl J Med 2005; 353: 1363-73. http://amedeo.com/lit.php?id=16192481 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/13/1363

59. Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. Lancet 2000; 355: 1845-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10866439

60. Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. N Engl J Med 2005; 352: 1839-42. Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/18/1839

61. Peiris JS, Yu WC, Leung CW, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. Lancet 2004; 363: 617-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14987888

62. Peters PH Jr, Gravenstein S, Norwood P, et al. Long-term use of oseltamivir for the prophylaxis of influenza in a vaccinated frail older population. J Am Geriatr Soc 2001; 49: 1025-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11555062

63. Relenza (zanamivir for inhalation). Research Triangle Park, NC: GlaxoSmithKline, 2003 (package insert). Accessed from http://www.InfluenzaReport.com/link.php?id=5

64. Smorodintsev AA, Zlydnikov DM, Kiseleva AM, Romanov JA, Kazantsev AP, Rumovsky VI. Evaluation of amantadine in artificially induced A2 and B influenza. JAMA 1970; 213: 1448-54. http://amedeo.com/lit.php?id=4915518

65. Snell P, Dave N, Wilson K, et al. Lack of effect of moderate hepatic impairment on the pharmacokinetics of oral oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate. Br J Clin Pharmacol 2005; 59: 598-601. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15842560

66. Stephenson I, Nicholson KG. Influenza: vaccination and treatment. Eur Respir J 2001; 17: 1282-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11491177 - Full text at http://erj.ersjournals.com/cgi/content/full/17/6/1282

67. Sugrue RJ, Hay AJ. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. Virology 1991; 180: 617-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1989386

68. Symmetrel (package insert). Endo Pharmaceuticals Inc., Chadds Ford, 2003. http://influenzareport.com/link.php?id=6

69. Tai CY, Escarpe PA, Sidwell RW, et al. Characterization of human influenza virus variants selected in vitro in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 3234-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9835519 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/full/42/12/3234?pmid=9835519

70. Tamiflu (package insert). Gilead Sciences, Foster City, 2005. Accessed on 8 January 2005 from http://www.rocheusa.com/products/tamiflu/pi.pdf

71. Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US Oral Neuraminidase Study Group. JAMA 2000; 283: 1016-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10697061 - Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/full/283/8/1016

72. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science 2005; 310: 77-80. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16210530

73. Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Mikulasova A, et al. Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 13849-54. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12368467 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/99/21/13849

74. Van Borm S, Thomas I, Hanquet G, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus in smuggled Thai eagles, Belgium. Emerg Infect Dis 2005; 11: 702-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15890123 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no05/05-0211.htm

75. Van Voris LP, Betts RF, Hayden FG, Christmas WA, Douglas RG Jr. Successful treatment of naturally occurring influenza A/USSR/77 H1N1. JAMA 1981; 245: 1128-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7007668

76. Varghese JN, Epa VC, Colman PM. Three-dimensional structure of the complex of 4-guanidino-Neu5Ac2en and influenza virus neuraminidase. Protein Sci 1995; 4: 1081-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7549872 - Full text at http://www.proteinscience.org/cgi/content/abstract/4/6/1081

77. Varghese JN, McKimm-Breschkin JL, Caldwell JB, Kortt AA, Colman PM. The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. Proteins 1992; 14: 327-32. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1438172

78. Welliver R, Monto AS, Carewicz O, et al. Effectiveness of oseltamivir in preventing influenza in household contacts: a randomized controlled trial. JAMA 2001; 285: 748-54. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11176912 - Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/285/6/748

79. Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, et al. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. Pediatr Infect Dis J 2001; 20: 127-33. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11224828

80. WHO 20000824. Donation of three million treatments of oseltamivir to WHO will help early response to an emerging influenza pandemic. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr36/en/index.html - Access 14 January 2006.

81. WHO 2004. WHO interim guidelines on clinical management of humans infected by influenza A (H5N1). Available from http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/clinicalmanage/en/index.html - accessed on 14 January 2006.

82. WHO 2005. The Writing Committee of the World Health Organization. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/extract/353/13/1374

83. WHO 2005b. Use of masks by health-care workers in pandemic settings. Available from http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/Mask%20Clarification10_11.pdf - Accessed on 14 January 2006.

84. WHO 2006. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. Accessed on 10 March 2006 from http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_03_08/en/ind ex.html

85. Wingfield WL, Pollack D, Grunert RR. Therapeutic efficacy of amantadine HCl and rimantadine HCl in naturally occurring influenza A2 respiratory illness in man. N Engl J Med 1969; 281: 579-84. http://amedeo.com/lit.php?id=4897137

86. Yen HL, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. J Infect Dis 2005; 192: 665-72. Epub 2005 Jul 15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16028136

87. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482437 - Full text at http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673698011829/fulltext

Chapter 10: Farmaci

Oseltamivir

Bernd Sebastian Kamps and Christian Hoffmann

(Green links: Free full-text articles)

Introduzione

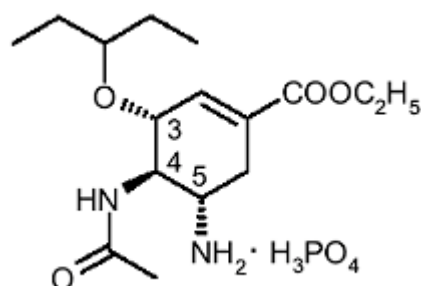
L'oseltamivir e' un potente e selettivo inibitore dell'enzima neuraminidasi dei virus influenzali A e B. L'enzima neuraminidasi e' responsabile per la scissione dei residui di acido sialico sui virioni di nuova formazione e gioca un ruolo fondamentale nel rilascio e nella disseminazione della progenie virale. Quando vengono esposti a oseltamivir, i virioni dell'influenza si aggregano sulla superfice della cellula ospite e di conseguenza il grado di infezione delle secrezioni mucose viene contenuto (McNicholl 2001) cosi' come l'infettivita' virale.

L'oseltamivir e' indicato nella profilassi dell'influenza e nel trattamento della malattia acuta influenzale senza complicazioni in pazienti di eta' uguale o superiore ad 1 anno che hanno mostrato sintomi per non piu' di 2 giorni. I ceppi H5N1 mostrano generalmente sensibilita' ad oseltamivir, ma dati sula sua efficacia clinica non sono disponibili.

Studi clinici hanno dimostrato che gli inibitori delle neuraminidasi possono diminuire la durata dei sintomi dovuti ad influenza se utilizzati entro 48 ore dall'inizio degli stessi sintomi. L'efficenza clinica e' di circa 60-70% e, per i trattamenti iniziati entro 48 ore, sintomi come mialgia, febbre, e mal di testa sono ridotti di circa 0.7-1.5 giorni (McNicholl 2001). Il trattamento e' piu' effettivo se iniziato entro 30 ore dall'inizio dei sintomi in pazienti con febbre. Il trattamento con oseltamivir non sembra avere effetti avversi sulle risposte immunitarie cellulari primarie *in vivo* contro l'infezione con influenza (Burger 2000).

L'oseltamivir e' generalmente ben tollerato e l'unico effetto collaterale clinicamente importante consiste in lievi disturbi gastrointestinali (Doucette 2001). Recentemente il farmaco e' stato messo in relazione con un numero di casi di disturbi psicologici e due suicidi di adolescenti in Giappone. Tuttavia, non esiste al momento evidenza di una relazione causale fra somministrazione di oseltamivir e suicidio.

Struttura

L'oseltamivir e' un profarmaco etilestere che richiede idrolisi dell'estere per essere convertito nella forma attiva, oseltamivir carboxilate [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate. La scoperta dell'oseltamivir fu possibile grazie alla progettazione razionale di farmaci che ha usato le strutture cristalline disponibili degli analoghi dell'acido sialico legati al sito attivo della neuraminidasi virale influenzale (Lew 2000). L'oseltamivir venne sviluppato attraverso modificazioni della struttura dell'analogo dell'acido sialico (che include l'aggiunta di una catena laterale lipofilica) che permettono l'uso orale del farmaco (Kim 1998). La formula strutturale e' la seguente:

Durante le fasi iniziali dello sviluppo l'oseltamivir e i suoi metaboliti attivi vennero chiamati GS4104 e Ro 64-0796, e GS4071 e Ro 64-0802, rispettivamente.

Farmacocinetiche

Successivamente alla somministrazione orale, l'oseltamivir viene facilmente assorbito dal tratto gastrointestinale. Dopo la conversione nel metabolita attivo l'oseltamivir viene carbossilato nel fegato, e si distribuisce a tutto l'organismo inclusi i tratti respiratori superiore ed inferiore (Doucette 2001). La biodisponibilita' assoluta del metabolita attivo dell'oseltamivir somministrato oralmente e' dell'80%. Il metabolita attivo e' osservabile nel plasma entro 30 minuti e raggiunge le concentrazioni massime dopo 3-4 ore. Una volta che le concentrazioni di picco plasmatiche vengono raggiunte, la concentrazione del metabolita attivo diminuisce con una vita media apparente di 6-10 ore (He 1999).

La vita media di eliminazione terminale dal plasma e' 1.8 ore in adulti sani. In pazienti con insufficenza renale, l'eliminazione del metabolita diminuisce linearmente con l'eliminazione della creatinina, e in media si ottiene dopo 23 ore in individui con una eliminazione di creatinina < 30ml/min (Doucette 2001). Una riduzione del dosaggio a 75 mg una volta al giorno e' raccomandata per pazienti con eliminazione della creatinina < 30ml/min (1.8 l/h) (He 1999).

Il legame alle proteine del plasma e' del 3%. Il farmaco e il metabolita attivo vengono secreti tramite filtrazione glomerulare e secrezione attiva tubulare senza ulteriore metabolismo (Hill 2001). I due composti non interagiscono con le ossidasi a funzione mista citocromo P450 o con le glucuronosiltransferasi (He 1999). C'e' quindi una bassa probabilita' di interazione con altri farmaci, che sembra limitata a quelle che sorgono dall'inibizione della secrezione competitiva da parte del trasportatore anionico delle cellule epiteliali dei tubuli renali. La secrezione renale di oseltamivir e' bloccata da probenecid che causa un aumento di piu' del doppio dell'esposizione sistemica a oseltamivir carbossilato (Hill 2002). Questa competizione non e' probabilmente significativa da un punto di vista clinico, ma ci sono state speculazioni riguardo all'uso di probenecid per "allungare" le scorte di oseltamivir in situazioni di carenza in una pandemia (Butler 2005).

Il metabolismo di oseltamivir non e' compromesso in pazienti con disfunzione epatica e non e' richiesto un aggiustamento della dose (Snell 2005).

In individui anziani, l'esposizione al metabolita attivo all'equilibrio e' piu' alta del 25% in confronto a individui giovani; tuttavia, non e' necessario un aggiustamento della dose (He 1999).

Bambini di eta' compresa fra gli 1 e i 12 anni eliminano il metabolita attivo oseltamivir carbossilato con velocita' superiore a bambini di eta' superiore e adulti, il che risulta in esposizione minore. L'aumento della dose a 2 mg/kg due volte al giorno risulta in esposizione al farmaco comparabile alla dose standard di 1 mg/kg due volte al giorno usata negli adulti (Oo 2001). Lattanti di 1 anno di eta' possono metabolizzare e secernere l'oseltamivir efficentemente (Oo, 2003). L'uso e' controindicato in lattanti di eta' inferiore ad 1 anno (vedi tossicita').

Tossicita'

Gli effetti collaterali piu' frequenti sono nausea e vomito generalmente di grado da lieve a moderato presenti normalmente nei primi 2 giorni di trattamento.

Le seguenti reazioni avverse sono state identificate durante l'uso post-marketing dell'oseltamivir. In molti casi non e' possibile stimarne la frequenza con sicurezza o stabilire una relazione causale all'esposizione a oseltamivir:

- Sfogo, gonfiore del viso o della lingua, necrolisi tossica epidermale
- Epatite, analisi delle funzioni epatiche anormale
- Aritmia
- Convulsioni, confusione
- Aggravamento del diabete

L'uso di oseltamivir non sembra essere associato con un aumento nel rischio di reazioni della pelle (Nordstrom 2004); tuttavia sono state riportate in maniera aneddotica rezioni della pelle isolate, ad esempio il caso di sfogo generalizzato in due pazienti con epatoma associato a cirrosi epatica (Kaji 2005) dopo l'uso profilattico di oseltamivir e zanamivir. Dopo una revisione accurata dei dati disponibili il FDA (negli Stati Uniti) ha richiesto che il foglietto illustrativo dell'oseltamivir aggiunga la possibilita di reazioni gravi nella pelle e ipersensibilita'. I pazienti devono essere avvertiti che nel caso di sviluppo di sfogo grave o sintomi allergici e' consigliabile sospendere il trattamento e contattare il loro medico curante (FDA 2005).

L'uso di oseltamivir in lattanti di eta' inferiore ad un anno non e' consigliato dal momento che studi in ratti giovani ha rivelato una potenziale tossicita' dell'oseltamivir in questa fascia d'eta'. In aggiunta, livelli alti di farmaco sono stati rivelati nel cervello di ratti di 7 giorni di eta' a cui era stata somministrata una dose singola di 1,000 mg/kg di oseltamivir fosfato (circa 250 volte maggiore della dose raccomandata nei bambini). Ulteriori studi hanno mostrato livelli di oseltamivir fosfato nel cervello circa 1,500 volte superiori a quelli rivelati negli animali adulti. La rilevanza clinica di questi dati preclinici per i lattanti umani non e' chiara. Tuttavia, data l'incertezza nel prevedere l'esposizione in lattanti con barriera emato-encefalica immatura, e' raccomandato

che l'oseltamivir non venga somministrato in bambini di eta' inferiore ad 1 anno, l'eta' in cui e' generalmente accettato che la barriera emato-encefalica raggiunge la maturita'. (Dear Doctor-Letter, http://InfluenzaReport.com/link.php?id=2).

L'oseltamivir e' classificato come farmaco di categoria C in gravidanza, dal momento che non ci sono dati sufficenti negli esseri umani su cui basare una valutazione del rischio in gravidanza per la madre o il feto.

In ratti che allattano, l'oseltamivir e' secreto nel latte, ma non ci sono studi che hanno analizzato madri che allattano e non e' noto se l'oseltamivir e' secreto nel latte umano.

Dopo che sono stati riportati disturbi psicologici in pazienti trattati con oseltamivir, le autorita' Giapponesi hanno cambiato il foglietto illustrativo ed aggiunto effetti psichiatrici come le allucinazioni, nella lista degli effetti collaterali.

Efficacia

Trattamento

La somministrazione di oseltamivir, 75 mg bid per 5 giorni, ad adulti altrimenti sani con influenza febbrile acquisita naturalmente, riduce la durata della malattia fino a 1.5 giorni e la gravita' della malattia fino al 38% se la somministrazione avviene entro 36 ore dall'inizio dei sintomi (Treanor 2000). Un'inizio ancora piu' precoce della terapia e' stato associato a risoluzione piu' veloce: l'inizio della terapia entro 12 ore dall'inizio della febbre puo' ridurre la durata totale media della malattia di piu' di 3 giorni in confronto all'intervento a 48 ore. In aggiunta, la somministrazione precoce di oseltamivir riduce la durata della febbre, la severita' dei sintomi e i tempi di ritorno all'attivita' normale (Aoki 2003).

Temperature corporee superiori ai 39°C furono associate ad una durata superiore della febbre (Kawai 2005). L'effetto dell'oseltamivir puo' essere apparente entro 24 ore dall'inizio del trattamento (Nichson 2000). Una meta-analisi di 10 studi con controllo con placebo, condotti in doppio cieco hanno suggerito che il trattamento della malattia influenzale con oseltamivir riduce le complicazioni del basso apparato respiratorio, l'uso di antibatterici, e l'ospitalizzazione sia in adulti sani che a rischio (Kaiser 2003).

L'efficacia e la sicurezza di oseltamivir in pazienti con malattia cronica respiratoria (bronchite cronica, enfisema ostruttivo, asma

bronchiale o bronchectiasi) o con malattia cronica cardiaca non e' stata definita. In uno studio di piccole dimensioni randomizzato l'oseltamivir ridusse significativamente l'incidenza di complicazioni (11% contro 45%) e l'uso di antibiotici (37% contro 69%) nel gruppo trattato in confronto al gruppo di controllo (Lin 2006). Il costo del trattamento dell'influenza e delle sue complicazioni risulto' comparabile fra i due gruppi.

E' possible che il trattamento con oseltamivir sia meno effettivo nell'influenza B in confronto all'influenza A (per l'efficacia contro i ceppi H5N1 vedi sotto).

Un modello per la decisione basato su costi-utilita', che include dati epidemiologici e dati da studi clinici di farmaci antivirali, ha concluso che per pazienti non vaccinati o per pazienti vaccinati ad alto rischio, il trattamento empirico con oseltamivir sembra essere effiicente dal punto di vista dei costi durante la stagione influenzale, mentre l'inizio del trattamento per altri pazienti dovrebbe aspettare i risultati di analisi diagnostiche rapide (Rothberg 2003).

Profilassi

L'uso profilattico di oseltamivir in individui infettati sperimentalmente e' risultato in un numero ridotto di infezioni (8/12 nel gruppo placebo e 8/21 nel gruppo trattato) e di malattia dovuta ad infezione dell'apparato respiratorio 4/12 contro 0/21; p=16; efficacia 61%) (Hayden 1999a). Questi risultati furono confermati da uno studio clinico in 1,599 adulti sani non immunizzati di eta' compresa fra i 18 e i 65 anni, a cui fu somministrato oseltamivir per via orale (75 mg o 150 mg al giorno) o placebo per sei settimane durante un periodo di picco influenzale locale (Hayden 1999b). Il rischio di sviluppare influenza nei soggetti assegnati a oseltamivir (1.2%) fu minore di quello nei soggetti assegnati al placebo (4.8%), con un'efficacia di protezione da oseltamivir del 74% (Hayden 1999a). Una meta-analisi di sette studi preventivi ha mostrato che la profilassi con oseltamivir riduce il rischio di sviluppare influenza del 70-90% (Cooper 2003).

Quando somministrato in modo profilattico ai contatti domestici di un caso di influenza all'indice (IC), una volta al giorno per 7 giorni entro 48 ore dall'inizio dei sintomi nell'IC, l'oseltamivir mostro' un efficacia protettiva generale contro influenza clinica dell'89% (Welliver 2001). In uno studio randomizzato, il 12.6% (26/206) di episodi di influenza clinica confermati in laboratorio occorsero nel gruppo placebo contro l'1.4% (3/209) nel gruppo trattato con

oseltamivir. In un altro studio randomizzato, venne analizzata l'efficacia della profilassi post-esposizione (PEP) e il trattamento di casi all'indice con malattia: i contatti domestici di casi all'indice che presentarono malattia simile all'influenza (definita come temperatura ≥37.8°C, piu' tosse e/o coryza) vennero randomizzati per ricevere PEP con oseltamivir per 10 giorni o trattamento al momento dello sviluppo di malattia durante il periodo post-esposizione. Tutti i casi all'indice ricevettero trattamento con oseltamivir per 5 giorni (Hayden 2004). La PEP ebbe efficacia protettiva del 68% contro influenza dimostrata, in confronto con il trattamento dei soli casi all'indice: 13% (33/258) episodi di influenza nel gruppo placebo contro 4% (10/244) nel gruppo trattato con oseltamivir (p=0.017).

Un'analisi dell'efficacia dei costi basata su un modello analitico di decisione con la prospettiva di un governo che paga ha calcolato che l'uso della profilassi con oseltamivir post-esposizione e' piu' efficace dal punto di vista dei costi della profilassi con amantidina o della mancanza di profilassi (Risebrough 2005). Un'altra meta-analisi recente ha pero' dimostrato una bassa efficacia dell'oseltamivir (Jefferson 2006), che ha portato gli autori a concludere che l'oseltamivir dovrebbe essere usato solo in epidemie serie o in pandemie insieme ad altre misure di salute pubblica.

Popolazioni di pazienti selezionate

Uno studio condotto in doppio cieco controllato con placebo ha studiato l'efficacia di oseltamivir somministrato una volta al giorno oralmente per 6 settimane come profilassi contro influenza clinica confermata in laboratorio in 548 **persone anziane** fragili (eta' media 81 anni, > 80% vaccinate) alloggiate in casa di riposo (Peters 2001). In confronto al placebo, l'oseltamivir risulto' in una riduzione del 92% nell'incidenza di influenza clinica confermata in laboratorio (1/276 = 0.4% contro 12/272 = 4.4%). L'oseltamivir ridusse anche in maniera significativa l'incidenza di complicazioni secondarie (Peters 2001).

Bambini: il trattamento orale con oseltamivir in **pazienti pediatrici** riduce la durata media della malattia di 36 ore cosi' come la tosse, coryza e la durata della febbre. In aggiunta, nuove diagnosi di otite media risultarono ridotte del 44% cosi' come venne abbassata l'incidenza della prescrizione di antibiotici da parte del medico (Whitley 2001). In uno studio recente, l'oseltamivir risulto' ben tollerato nei bambini asmatici con il potenziale di ridurre la durata dei sintomi e di migliorare le funzioni polmonari. Pazienti trattati con oseltamivir mostrarono

anche un numero minore di esacerbazioni dell'asma (51% contro 68%) (Johnston 2005).

L'efficacia dell'oseltamivir nel trattamento di soggetti con **malattia cardiaca cronica e/o malattia respiratoria** non e' stata stabilita. Non e' disponibile informazione che riguarda il trattamento dell'influenza in pazienti con condizioni mediche sufficentemente gravi o instabili da essere considerati a rischio imminente di ospitalizzazione. In pazienti che hanno subito **trapianto del midollo osseo** l'oseltamivir si potrebbe rivelare come una buona scelta durante i primi 6 mesi dopo il trapianto quando le strategie di vaccinazione preventiva sono precluse a causa della poca immugenicita' del vaccino in questo periodo (Machado 2004).

Efficacia contro l'influenza aviaria H5N1

Studi *in vitro* hanno dimostrato un'attivita' antivirale potente contro tutti i ceppi di influenza A e B inclusi i ceppi di influenza aviaria H5N1 e H9N2 implicati nei casi umani di Hong Kong (Leneva 2000). Una revisione dei casi di influenza H5N1, fatta dal WHO, ha suggerito che la dispersione del virus e l'infettivita' dei casi all'indice potrebbe essere ridotta (Writing Committee of the WHO 2005). Tuttavia, il beneficio clinico dell'oseltamivir nelle infezioni umane con influenza aviaria non e' ben definito. Osservazioni recenti suggeriscono che in certi pazienti con infezione virale da H5N1, il trattamento con la dose raccomandata di oseltamivir non sopprime la replicazione del virus in modo completo e consente lo stabilirsi di condizioni che permettono lo sviluppo di resistenza al farmaco (de Jong 2005). E' ancora in discussione la possibilita' che l'oseltamivir possa essere prescritto in dosi maggiori o per periodi piu' lunghi rispetto alle raccomandazioni esistenti. Un'altra domanda senza risposta riguarda l'inizio del trattamento ad uno stadio avanzato della malattia, quando c'e' evidenza di replicazione virale. Esiste solo evidenza molto limitata che l'inizio del trattamento tardi possa ridurre il carico virale a livelli sotto la soglia del rivelamento e che possa aver contribuito alla sopravvivenza di certi pazienti (de Jong 2005). Questi risultati sono consistenti con studi in topi inoculati con H5N1. Mentre un regime per 5 giorni a 10mg/kg/die risulto' protettivo nel 50% dei topi, un regime di 8 giorni dimostro' un tasso di sopravvivenza dell'80% (Yen 2005b). In un altro studio il trattamento con oseltamivir miglioro' la sopravvivenza nei topi dallo 0% al 75%, anche quando la terapia venne rimandata fino a 5 giorni dopo l'infezione con virus umano dell'influenza (McCullers 2004).

Dosi di oseltamivir piu' alte negli esseri umani potrebbero rivelarsi sicure da usarsi. Dati derivati da studi sul dosaggio mostrano che una somministrazione per 5 giorni di 150 mg due volte al giorno per il trattamento, e di 75 mg due volte al giorno per 6 settimane per la profilassi sono tollerate tanto quanto le dosi approvate (Ward 2005).

Efficacia contro il ceppo dell'influenza del 1918

Virus ricombinanti che possiedono NA del 1918 o sia HA che NA del 1918 vennero inibiti dall'oseltamivir in maniera effettiva sia in colture di tessuti che in topi, che suggerisce la possibile efficacia dell'oseltamivir contro un virus riemergente o simile a quello del 1918 (Tumpey 2002).

Resistenza

Le mutazioni E119V, R292K, H274Y, e R152K della proteina NA *in vitro* sono associate con la resistenza ad oseltamivir (McKimm-Breschkin 2003). Ceppi virali che contengono la mutazione R292K non ebbero in un modello murino la stessa capacita' di replicazione del virus selvatico e mostrarono infettivita' 10,000 volte inferiore del virus selvatico (Tai 1998). Allo stesso modo, la mutazione H274Y ridusse la replicabilita' in colture cellulari fino a tre log (Ives 2002), richiese una dose 100 volte maggiore per l'infezione di furetti donatori, e dimostro' una trasmissione piu' lenta in confronto al ceppo selvatico (Herlocher 2004).

E' stato suggerito che se le mutazioni compromettono la vitalita' del virus, e' possibile che non abbiano significato clinico. I casi pubblicati recentemente di alto livello di resistenza all'oseltamivir in un ceppo H5N1 fanno dubitare la validita' di questa ipotesi (Le 2005, de Jong 2005). In questo caso il trattamento con la dose raccomandata di oseltamivir, sebbene iniziata un giorno dopo l'inizio dei sintomi, non soppresse la replicazione virale in modo efficente e porto' alla fine allo sviluppo di un ceppo resistente al farmaco. La causa di questo evento – replicazione virale che prende il sopravvento o alterata farmacocinetica – non e' chiara.

Sebbene l'incidenza di sviluppo di ceppi resistenti di influenza stagionale H1N1 e H3N2 si e' rivelata bassa negli adulti e negli adolescenti (0.3%), studi in pediatria hanno mostrato tassi maggiori. Uno studio trovo' mutazioni nella neuraminidasi in virus da 9/50 pazienti (18%), sei dei quali mostrarono mutazioni nella posizione 292 e due nella posizione 119 (Kiso 2004). Dal momento che i bambini possono essere un'origine di trasmissione

virale, anche dopo 5 giorni di trattamento con oseltamivir, le implicazioni di questi risultati devono essere investigate con cura.

Resistenza incrociata tra mutanti dell'influenza resistenti all'oseltamivir e mutanti resistenti allo zanamivir e' stata osservata *in vitro*. In isolati clinici, due delle tre mutazioni indotte da oseltamivir (E119V, H274Y e R292K) nella neuraminidasi, accadono negli stessi residui amminoacidici di due delle tre mutazioni (E119G/A/D, R152K e R292K) osservate in virus resistenti allo zanamivir (Tamiflu 2005).

Interazioni coi farmaci

L'informazione derivata da studi di farmacologia e farmacocinetica suggerisce che non sono probabili interazioni clinicamente significative con altri farmaci (Tamiflu 2005). Ne' oseltamivir, ne' oseltamivir carbossilato sono un substrato per, o un inibitore delle, isoforme del citocromo P450.

Raccomandazioni per l'uso

EU

L'oseltamivir (Tamifu®) e' stato approvato per l'uso a livello centrale nell'Unione Europea. Le indicazioni per il trattamento e i dosaggi corrispondono all'autorizzazione alla vendita negli Stati Uniti.

US

Negli US, l'oseltamivir e' indicato per il trattamento di malattia acuta senza complicazioni dovuta ad influenza in pazienti di eta' uguale o superiore a 1 anno che sono sintomatici da non piu' di due giorni. In aggiunta, l'oseltamivir e' indicato per la profilassi dell'influenza in pazienti di eta' uguale o superiore a 1 anno.

La dose standard per il **trattamento** in pazienti di eta' uguale o superiore ai 13 anni e' di 75 mg bid per 5 giorni. Pazienti pediatrici o adulti che non possono deglutire le capsule ricevono una sospensione orale di oseltamivir che contiene 20, 45 e 60 mg due volte al giorno. Dose raccomandata:

Peso corporeo	Dose raccomandata per 5 giorni
≤ 15 kg (≤ 33 lb)	30 mg due volte al giorno
> 15 kg fino a 23 kg (> 33 lb fino a 51 lb)	45 mg due volte al giorno
> 23 kg fino a 40 kg (> 51 lb fino a 88 lb)	60 mg due volte al giorno
> 40 kg (> 88 lb)	75 mg due volte al giorno

Una capsula da 75 mg e' un'opzione accettabile in bambini (di eta' ad esempio superiore agli 8 anni) che possono deglutire forme solide del dosaggio.

Per la **profilassi** la dose raccomandata e' di 75 mg una volta al giorno per almeno 7 gioni. La dose raccomandata di sospensione orale di oseltamivir per pazienti pediatrici di eta' uguale o supeiore a 1 anno successivamente a contatto con un individuo infetto:

Peso corporeo	Dose raccomandata per 5 giorni
≤ 15 kg (≤ 33 lb)	30 mg una volta al giorno
> 15 kg fino a 23 kg (> 33 lb fino a 51 lb)	45 mg una volta al giorno
> 23 kg fino a 40 kg (> 51 lb fino a 88 lb)	60 mg una volta al giorno
> 40 kg (> 88 lb)	75 mg una volta al giorno

Sommario

L'oseltamivir e' un inibitore selettivo della neuraminidasi. Il trattamento deve iniziare entro 48 ore dall'inizio dei sintomi, ma mostra la maggiore efficenza se iniziato il prima possibile (<24 ore). Il farmaco e' generalmente ben tollerato.

L'oseltamivir non deve essere considerato come sostitutivo della vaccinazione annuale precoce, cosi' come raccomandato dalle autorita' nazionali.

L'efficacia, il dosaggio ottimale e la durata del trattamento in infezioni da H5N1 devono ancora essere definite

Nome commerciale: Tamiflu™

Capsule da 75 mg (confezionate in da 10).

Polvere per la sospensione orale da essere ricostituita con acqua (12 mg/ml; disponibile in bottiglie di vetro contenenti 25 ml di sospensione).

Classe del farmaco: inibitore della neuraminidasi.

Produttore: Hoffmann-La Roche.

Indicazioni: malattia acuta senza complicazioni dovuta ad infezione con influenza in pazienti di eta' superiore o uguale ad 1 anno che sono stati sintomatici per non piu' di due giorni.

Profilassi dell'influenza in pazienti di eta' superiore ad 1 anno.

Dosaggio standard per il trattamento: 75 mg bid per 5 giorni.

Pazienti pediatrici o adulti che non possono deglutire, ricevono la sospensione orale. Dose raccomandata: vedi sopra.

Dosaggio standard per la profilassi: 75 mg una volta al giorno per almeno 7 giorni in seguito a contatto con individui infetti.

Pazienti pediatrici o adulti che non possono deglutire, ricevono la sospensione orale. Dose raccomandata: vedi sopra.

Dosaggi speciali: pazienti con eliminazione della creatinina dal siero fra 10 e 30 ml/min vengono trattati con 75 mg una volta al giorno per 5 giorni; la dose per la profilassi e' di 75 mg ogni due giorni o 30 mg di sospensione orale ogni giorno. Non sono disponibili regimi di dosaggio raccomandati per pazienti che ricevono emodialisi di routine e trattamento continuo di dialisi peritoneale con malattia renale terminale.

Farmacocinetiche: l'oseltamivir viene assorbito facilmente dal tratto gastrointestinale in seguito a somministrazione orale ed e' convertito in maniera estensiva a oseltamivir carbossilato. L'oseltamivir carbossilato e' eliminato nell'urina con una vita media di 6-10 ore.

Controindicazioni: l'oseltamivir non e' indicato per il trattamento dell'influenza in pazienti pediatrici di eta' inferiore ad 1 anno.

L'oseltamivir dovrebbe essere usato in gravidanza solo se i benefici potenziali giustificano i rischi potenziali per il feto (Categoria del farmaco in relazione alla gravidanza: C)

Interazioni: sono improbabili interazioni significative con altri farmaci.

Effetti collaterali: gli effetti collaterali piu' frequenti sono nausea e vomito e sono generalmente di gradazione leggera o moderata e accadono usualmente nei primi due giorni del trattamento.

Commenti/Avvertenze: i pazienti devono essere avvertiti ad iniziare il trattamento con oseltamivir il prima possibile dopo l'apparizione di sintomi influenzali. Allo stesso modo, e' consigliabile che la prevenzione avvenga il prima possibile in seguito ad esposizione.

Disturbi gastrointestinali transienti possono essere evitati somministrando l'oseltamivir dopo uno spuntino.

Non e' richiesto un aggiustamento della dose in geriatria.

La co-somministrazione con il cibo non ha effetti significativi sulle concentrazioni di picco plasmatiche e l'AUC.

Conservare le capsule a 25°C (77° F); escursioni di temperatura permesse da 15° a 30° C (da 59° a 86° F).

E' raccomandato che la sospensione orale venga ricostituita dal farmacista prima della consegna al paziente (vedi informazione sul prodotto in Internet).

Conservare la sospensione ricostituita in frigorifero da 2° a 8° C (da 36° a 46° F). Non congelare.

L'oseltamivir non e' sostitutivo della vaccinazione antinfluenzale. E' consigliato che i pazienti continuino a ricevere la vaccinazione antinfluenzale annualmente in accordanza con le raccomandazioni nazionali sulle pratiche di immunizzazione.

Internet sources:

EU: http://influenzareport.com/link.php?id=14

USA: http://influenzareport.com/link.php?id=1

Referenze

1. Aoki FY, Macleod MD, Paggiaro P, et al. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 123-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12493796 - Full text at http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/full/51/1/123
2. Burger RA, Billingsley JL, Huffman JH, Bailey KW, Kim CU, Sidwell RW. Immunological effects of the orally administered neuraminidase inhibitor oseltamivir in influenza virus-infected and uninfected mice. Immunopharmacology 2000; 47: 45-52. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10708809
3. Butler D. Wartime tactic doubles power of scarce bird-flu drug. Nature 2005; 438: 6.
4. Calfee DP, Hayden FG. New approaches to influenza chemotherapy. Neuraminidase inhibitors. Drugs 1998; 56: 537-53. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9806102
5. Carr J, Ives J, Kelly L, et al. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. Antiviral Res 2002; 54: 79-88. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12062393
6. Centers for Disease Control. Neuraminidase inhibitors for treatment of influenza A and B infections. MMWR Recomm Rep 1999; 48: 1-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10632443 - Full text at http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr4814a1.htm
7. Chokephaibulkit K, Uiprasertkul M, Puthavathana P, et al. A child with avian influenza A (H5N1) infection. Pediatr Infect Dis J 2005; 24: 162-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15702046
8. Cooper NJ, Sutton AJ, Abrams KR, Wailoo A, Turner D, Nicholson KG. Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of influenza A and B: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. BMJ 2003; 326: 1235.

Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12791735 - Full text at http://bmj.bmjjournals.com/cgi/content/full/326/7401/1235

9. de Jong MD, Tran TT, Truong HK, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. N Engl J Med 2005; 353: 2667-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16371632 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/25/2667
10. Doucette KE, Aoki FY. Oseltamivir: a clinical and pharmacological perspective. Expert Opin Pharmacother 2001; 2: 1671-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11825310
11. Dreitlein WB, Maratos J, Brocavich J. Zanamivir and oseltamivir: two new options for the treatment and prevention of influenza. Clin Ther 2001; 23: 327-55. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11318072
12. Dutkowski R, Thakrar B, Froehlich E, Suter P, Oo C, Ward P. Safety and pharmacology of oseltamivir in clinical use. Drug Saf 2003; 26: 787-801. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12908848
13. FDA - Food & Drug Administration. FDA Approves Tamiflu for Prevention of Influenza in Children Under Age 12. Accessed on 8 January 2006 from http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2005/NEW01285.html
14. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. Lancet 2000; 355: 827-35. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10711940
15. Gubareva LV, Kaiser L, Matrosovich MN, Soo-Hoo Y, Hayden FG. Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. J Infect Dis 2001; 183: 523-31. Epub 2001 Jan 11. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11170976 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v183n4/000943/000943.html
16. Hayden FG, Treanor JJ, Fritz RS, et al. Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. JAMA 1999a; 282: 1240-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10517426 - Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/full/282/13/1240
17. Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, et al. Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. N Engl J Med 1999b; 341: 1336-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10536125 - http://content.nejm.org/cgi/content/full/341/18/1336
18. Hayden FG, Jennings L, Robson R, et al. Oral oseltamivir in human experimental influenza B infection. Antivir Ther 2000; 5: 205-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11075941
19. Hayden FG, Belshe R, Villanueva C, et al. Management of influenza in households: a prospective, randomized comparison of oseltamivir treatment with or without postexposure prophylaxis. J Infect Dis 2004; 189: 440-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14745701 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v189n3/31422/31422.html
20. He G, Massarella J, Ward P. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. Clin Pharmacokinet 1999; 37: 471-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10628898
21. Herlocher ML, Truscon R, Elias S, et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. J Infect Dis 2004; 190: 1627-30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15478068
22. Hill G, Cihlar T, Oo C, et al. The anti-influenza drug oseltamivir exhibits low potential to induce pharmacokinetic drug interactions via renal secretion-correlation of in vivo and in vitro studies. Drug Metab Dispos 2002; 30: 13-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11744606 - Full text at http://dmd.aspetjournals.org/cgi/content/full/30/1/13
23. Hurt AC, Barr IG, Durrant CJ, Shaw RP, Sjogren HM, Hampson AW. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance in human influenza viruses from Australia. Commun Dis Intell 2003; 27: 542-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15508516

24. Hurt AC, Barr IG, Hartel G, Hampson AW. Susceptibility of human influenza viruses from Australasia and South East Asia to the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir. Antiviral Res 2004; 62: 37-45. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15026200
25. Ives JA, Carr JA, Mendel DB, et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. Antiviral Res 2002; 55: 307-17. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12103431
26. Johnston SL, Ferrero F, Garcia ML, Dutkowski R. Oral oseltamivir improves pulmonary function and reduces exacerbation frequency for influenza-infected children with asthma. Pediatr Infect Dis J 2005; 24: 225-32. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15750458
27. Kaiser L, Wat C, Mills T, Mahoney P, Ward P, Hayden F. Impact of oseltamivir treatment on influenza-related lower respiratory tract complications and hospitalizations. Arch Intern Med 2003; 163: 1667-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12885681 - Full text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/full/163/14/1667
28. Kaji M, Fukuda T, Tanaka M, Aizawa H. A side effect of neuraminidase inhibitor in a patient with liver cirrhosis. J Infect Chemother 2005; 11: 41-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15729487
29. Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, et al. Factors influencing the effectiveness of oseltamivir and amantadine for the treatment of influenza: a multicenter study from Japan of the 2002-2003 influenza season. Clin Infect Dis 2005; 40: 1309-16. Epub 2005 Mar 16. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15825034
30. Kemink SA, Fouchier RA, Rozendaal FW, et al. A fatal infection due to avian influenza-A (H7N7) virus and adjustment of the preventive measures. Ned Tijdschr Geneeskd 2004; 148: 2190-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15559415
31. Kim CU, Lew W, Williams MA, et al. Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. J Med Chem 1998; 41: 2451-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9651151
32. Kim CU, Chen X, Mendel DB. Neuraminidase inhibitors as anti-influenza virus agents. Antivir Chem Chemother 1999; 10: 141-54. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10480735
33. Kirkbride HA, Watson J. Review of the use of neuraminidase inhibitors for prophylaxis of influenza. Commun Dis Public Health 2003; 6: 123-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12889291
34. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet 2004; 364: 759-65. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15337401
35. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet 2004; 363: 587-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14987882
36. Le QM, Kiso M, Someya K, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. Nature 2005; 437: 1108. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16228009
37. Leneva IA, Roberts N, Govorkova EA, Goloubeva OG, Webster RG. The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza viruses. Antiviral Res 2000; 48: 101-15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11114412
38. Lew W, Chen X, Kim CU. Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor. Curr Med Chem 2000; 7: 663-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10702632
39. Lin JT, Yu XZ, Cui DJ, et al. A multicentre, randomized, controlled trial of oseltamivir in the treatment of influenza in a high-risk Chinese population. Curr Med Res Opin 2006; 22: 75-82. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16393433
40. Machado CM, Boas LS, Mendes AV, et al. Use of Oseltamivir to control influenza complications after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 2004; 34: 111-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15094755

41. Massarella JW, He GZ, Dorr A, Nieforth K, Ward P, Brown A. The pharmacokinetics and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir (Ro 64-0796/GS4104) in healthy adult and elderly volunteers. J Clin Pharmacol 2000; 40: 836-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10934667
42. McClellan K, Perry CM. Oseltamivir: a review of its use in influenza. Drugs 2001; 61: 263-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11270942
43. McCullers JA. Effect of antiviral treatment on the outcome of secondary bacterial pneumonia after influenza. J Infect Dis 2004; 190: 519-26. Epub 2004 Jun 30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15243927 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v190n3/32166/32166.html
44. McGeer AJ, Lee W, Loeb M, et al. Adverse effects of amantadine and oseltamivir used during respiratory outbreaks in a center for developmentally disabled adults. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25: 955-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15566030
45. McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2264-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12821478 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/full/47/7/2264?pmid=12821478
46. McNicholl IR, McNicholl JJ. Neuraminidase inhibitors: zanamivir and oseltamivir. Ann Pharmacother 2001; 35: 57-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11197587
47. Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. Lancet 2000; 355: 1845-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10866439
48. Nordstrom BL, Oh K, Sacks ST, L'Italien GJ. Skin reactions in patients with influenza treated with oseltamivir: a retrospective cohort study. Antivir Ther 2004; 9: 187-95. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15134180
49. Oo C, Barrett J, Hill G, et al. Pharmacokinetics and dosage recommendations for an oseltamivir oral suspension for the treatment of influenza in children. Paediatr Drugs 2001; 3: 229-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11310719
50. Oo C, Barrett J, Dorr A, Liu B, Ward P. Lack of pharmacokinetic interaction between the oral anti-influenza prodrug oseltamivir and aspirin. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1993-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12019123 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/full/46/6/1993?pmid=12019123
51. Oo C, Hill G, Dorr A, Liu B, Boellner S, Ward P. Pharmacokinetics of anti-influenza prodrug oseltamivir in children aged 1-5 years. Eur J Clin Pharmacol 2003; 59: 411-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12910331
52. Peters PH Jr, Gravenstein S, Norwood P, et al. Long-term use of oseltamivir for the prophylaxis of influenza in a vaccinated frail older population. J Am Geriatr Soc 2001; 49: 1025-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11555062
53. Risebrough NA, Bowles SK, Simor AE, McGeer A, Oh PI. Economic evaluation of oseltamivir phosphate for postexposure prophylaxis of influenza in long-term care facilities. J Am Geriatr Soc 2005; 53: 444-51. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15743287
54. Rothberg MB, Bellantonio S, Rose DN. Management of influenza in adults older than 65 years of age: cost-effectiveness of rapid testing and antiviral therapy. Ann Intern Med 2003; 139: 321-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12965940 - Full text at http://www.annals.org/cgi/reprint/139/5_Part_1/321.pdf
55. Sander B, Gyldmark M, Hayden FG, Morris J, Mueller E, Bergemann R. Influenza treatment with neuraminidase inhibitors Cost-effectiveness and cost-utility in healthy adults in the United Kingdom. Eur J Health Econ 2005; 6: 244-52. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15875227
56. Sato M, Hosoya M, Kato K, Suzuki H. Viral shedding in children with influenza virus infections treated with neuraminidase inhibitors. Pediatr Infect Dis J 2005; 24: 931-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16220098

57. Schmidt AC. Antiviral therapy for influenza : a clinical and economic comparative review. Drugs 2004; 64: 2031-46. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15341496

58. Shijubo N, Yamada G, Takahashi M, Tokunoh T, Suzuki T, Abe S. Experience with oseltamivir in the control of nursing home influenza A outbreak. Intern Med 2002; 41: 366-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12058885

59. Snell P, Dave N, Wilson K, et al. Lack of effect of moderate hepatic impairment on the pharmacokinetics of oral oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate. Br J Clin Pharmacol 2005; 59: 598-601. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15842560

60. Stiver G. The treatment of influenza with antiviral drugs. CMAJ 2003; 168: 49-56. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12515786 - Full text at http://www.cmaj.ca/cgi/content/full/168/1/49

61. Tai CY, Escarpe PA, Sidwell RW, et al. Characterization of human influenza virus variants selected in vitro in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 3234-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9835519 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/full/42/12/3234?pmid=9835519

62. Takahashi K, Furuta Y, Fukuda Y, et al. In vitro and in vivo activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus. Antivir Chem Chemother 2003; 14: 235-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14694986

63. Tamiflu (package insert). Gilead Sciences, Foster City, 2005. Accessed on 8 January 2005 from http://www.rocheusa.com/products/tamiflu/pi.pdf

64. Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. JAMA 2000; 283: 1016-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10697061 - Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/full/283/8/1016

65. Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Mikulasova A, et al. Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 13849-54. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12368467 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/99/21/13849

66. Ward P, Small I, Smith J, Suter P, Dutkowski R. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. J Antimicrob Chemother 2005; 55: Suppl 1: Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15709056

67. Welliver R, Monto AS, Carewicz O, et al. Effectiveness of oseltamivir in preventing influenza in household contacts: a randomized controlled trial. JAMA 2001; 285: 748-54. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11176912 - Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/full/285/6/748

68. Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, et al. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. Pediatr Infect Dis J 2001; 20: 127-33. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11224828

69. Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. http://amedeo.com/lit.php?id=16192482 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/extract/353/13/1374

70. Woodhead M, Lavanchy D, Johnston S, Colman P, Fleming D. Neuraminidase inhibitors: progress in the management of influenza. Int J Clin Pract 2000; 54: 604-10. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11220989

71. Yen HL, Herlocher LM, Hoffmann E, et al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4075-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16189083

72. Yen HL, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. J Infect Dis 2005; 192: 665-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16028136

Rimantadina

Bernd Sebastian Kamps and Christian Hoffmann

(Green links: Free full-text articles)

Introduzione

La rimantidina e' un inibitore del canale ionico M2 che inibisce in maniera specifica la replicazione dei virus A dell'influenza a causa della sua interferenza nel processo di svestimento del virus. Gli inibitori di M2 bloccano il canale ionico formato dalla proteina M2 e che attraversa la membrana virale (Hay 1985, Sugrue 1991). Il virus dell'influenza penetra la cellula ospite via endocitosi mediata da recettore. Successivamente all'entrata e' necessaria l'acidificazione delle vesciche endocitotiche per la dissociazione della proteina M1 dai complessi ribonucleoproteici. Solo a questo punto le particelle ribonucleoproteiche sono importate al nucleo attraverso i pori nucleari. Gli ioni idrogeno richiesti per l'acidificazione passano attraverso il canale M2. La rimantidina blocca questo canale (Bui 1996).

Il farmaco e' effettivo contro i sottotipi di influenza A che hanno causato malattia negli esseri umani in precedenza (H1N1, H2N2 e H3N3), ma non contro il virus B dell'influenza perche' la proteina M2 e' unicamente presente nei virus A dell'influenza. La rimantidina non e' attiva contro il virus influenzale aviario sottotipo H5N1 che ha causato recentemente malattia negli esseri umani (Li 2004).

Sia per la prevenzione che per il trattamento di influenza A, la rimantidina ha efficacia simile a quella dell'amantidina ma minor potenziale a causare effetti collaterali avversi (Stephenson 2001, Jefferson 2004).

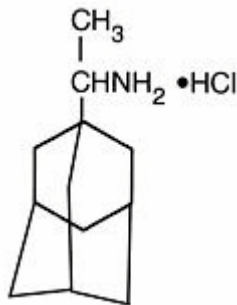
Sembra che la rimantidina non abbia effetti avversi allo sviluppo di anticorpi neutralizzanti contro ceppi di influenza. Tuttavia in uno studio la presenza di IgA nelle secrezioni nasali venne rilevata come significamente diminuita (Clover 1991).

Uno studio pubblicato di recente ha rivelato che nella scorsa decade c'e' stato un aumento allarmante nell'incidenza d virus A dell'influenza H3N2 resistenti sia all'amantidina che alla rimantidina. In uno studio pubblicato recentemente che ha valutato piu' di 7,000 virus A dell'influenza ottenuti a livello mondiale dal 1994 al 2005, e' stao determinato che la resistenza

ad amantidina e rimantidina e' aumentata dallo 0.4% al 12.3% (Bright 2005). Virus raccolti nel 2004 da Corea del Sud, Taiwan, Hong Kong e Cina mostrano frequenze di riesistenza pari a 15% 15 %, 23 %, 70 %, e 74 % rispettivamente. Certi autori hanno suggerito che l'uso di amantidina e rimantidina dovrebbe essere scoraggiato (Jefferson 2006). Recentemente e' stato riveleato che 109 su 120 (91%) dei virus dell'influenza A H3N2 isolati da pazienti negli Stati Uniti, contenevano un cambio in amminoacidi nella posizione 31 della proteina M2 che conferisce resistenza ad amantidina e rimantidina. Sulla base di questi risultati, il CDC (Center for Disease Control negli Stati Uniti) ha rilasciato una raccomandazione che previene l’uso di amantidina e rimantidina per il trattamento o la profilassi dell’influenza A negli Stati Uniti per il resto della stagione influenzale 2005-2006 (CDC 2006).

Nella maggioranza delle nazioni non c'e' disponibilita' di rimantidina.

Struttura

Chimicamente la rimantidina idrocloride e' alfa-metilciclo-[3.3.1.1/3.7}decano-1-metanamina idrocloride con un peso molecolare di 215.77 e la seguente formula strutturale:

Farmacocinetiche

In adulti sani si raggiunge il picco di concentrazione nel plasma 6 ore dopo la somministrazione orale. La vita media di eliminazione di una dose singola e' di circa 30 ore sia negli adulti (Hayden 1985) che nei bambini (Anderson 1987). Dopo la somministrazione orale la rimantidina viene metabolizzata in maniera estensiva nel fegato e meno del 25% della dose viene secreta immutata nell'urina. Nelle persone anziane l'eliminazione

e' prolungata, con valori AUC medi e picchi di concentrazione piu' elevati del 20-30% degli adulti.

In persone con malattia epatica cronica le farmacocinetiche della rimantidina non cambiano in maniera apprezzabile; tuttavia, in pazienti con insufficenza epatica grave la AUC e la vita media di eliminazione sono aumentate.

Insufficenza renale risulta in elevate concentrazioni nel plasma di metaboliti della rimantidina. L'emodialisi non elimina la rimantidina. Di conseguenza e' possibile che il dosaggio della rimantidina in pazienti con malattia renale ad uno stadio terminale debba essere ridotto. Non sono richieste dosi supplementari nei giorni di dialisi (Capparelli 1988).

Tossicita'

Gli eventi avversi piu' frequentemente associati con la rimantidina sono sintomi gastrointestinali. Altri effetti collaterali notati durante le analisi cliniche sono stati nausea, vomito, anoressia e secchezza delle fauci, cosi' come sintomi del CNS (insonnia, giramenti di testa, nervosismo). Uno studio sull'efficacia e la sicurezza dell'uso profilattico a lunga durata condotto in case di riposo ha pero' rivelato che non ci sono differenze statisticamente significative fra la frequenza di sintomi gastrointestinali o del sistema nervoso centrale fra gruppi trattati e gruppi che ricevono placebo (Monto 1995).

Eventi avversi meno frequenti (0.3-1%) sono diarrea, dispepsia, perdita di concentrazione, atassia, sonnolenza, agitazione, depressione, sfogo, tinnito e dispnea.

Raramente pazienti possono sviluppare convulsioni, ma questo in pazienti con una storia di convulsioni precedente e che non stanno ricevendo trattamento anticonvulsivo. In questi casi la rimantidina deve essere sospesa.

Generalmente i sintomi si risolvono rapidamente dopo la sospensione del trattamento.

La sicurezza e le farmacocinetiche della rimantidina in pazienti con insufficenza renale ed epatica sono state valutate solo dopo la somministrazione di una dose singola. A causa dell'accumulazione della rimantidina e dei suoi metaboliti nel plasma, e' consigliabile esercitare estrema cura quando si trattano pazienti con insufficenza epatica o renale.

Non sono stati condotti studi sufficentemente controllati per valutare la sicurezza della somministrazione di amantidina in gravidanza. Di conseguenza noi raccomandiamo che la rimantidina non venga prescritta a donne gravide. Allo stesso modo la rimantidina non dovrebbe essere prescritta durante l'allattamento a causa degli effetti collaterali notati nella prole di ratti trattati con rimantidina mentre in fase di allattamento.

Studi comparativi indicano che la rimantidina e' meglio tollerata dell'amantidina a dosi equivalenti (Jefferson 2004). In una comparazione diretta dell'uso profilattico di amantidina e rimantidina si ritirarono dallo studio piu' pazienti trattati con amantidina (13%) che pazienti trattati con rimantidina (6%) a causa di effetti collaterali che interessarono il sistema nervoso centrale (Dolin 1982).

Efficacia

La rimantidina non e' attiva conto i ceppi di influenza aviaria sottotipo H5N1 che hanno recentemente causato malattia negli esseri umani (Li 2004). La rimantidina puo' essere effettiva sia per la prevenzione che il trattamento di infezioni umane "classiche" con ceppi di influenza A (H1N1, H2N2 e H3N2). In una Cochrane review di 3 studi controllati con placebo sugli effetti profilattici della rimantidina e' stato pero' rivelato che la rimantidina ha solo effetto moderato nei casi di influenza e di malattia simile all'influenza (Jefferson 2006). Durante il trattamento la rimantidina ebbe l'effetto di ridurre significativamente la durata della febbre, ma non ebbe nessun effetto o, al meglio, ebbe effetto moderato sul rilascio nasale di virus A dell'influenza. La bassa efficacia di rimantidina insieme al tasso relativamente elevato di eventi avversi ha portato gli autori a concludere che l'uso di entrambi i farmaci bloccanti del canale ionico M2, amantidina e rimantidina, dovrebbe essere scoraggiato durante influenza stagionale e pandemie (Jefferson 2006) (si vedano anche le raccomandazioni del CDC nell'introduzione).

Trattamento

In studi iniziali che coinvolsero pazienti con infezione col virus influenzale A sottotipo H3N2 senza complilcazioni, il trattamento con rimantidina (200 mg/die per 5 giorni) venne associato con riduzioni significative dei titoli virali nelle secrezioni nasali, della temperatura massima, del tempo fino allo sfebbramento (in media di 37 ore piu' breve), e dei sintomi sistemici quando comparati con placebo (Hayden 1986). La rimantidina sembra essere relativamente sicura anche nel trattamento di persone anziane

vaccinate che vivono in casa di riposo. In questa popolazione, e' raccomandata una riduzione del dosaggio a 100 mg/die. In adulti infettati sperimentalmente, la rimantidina non ebbe effetto sul rilascio del virus nelle secrezioni nasali, sull'eliminazione da parte del sistema mucociliare, sulla presenza di sintomi e segni nasali o complicazioni otoriniche (Doyle 1998).

Profilassi

I tassi di efficacia riportati da studi profilattici hanno ampie variazioni. Una revisione degli studi clinici ha trovato che la rimantidina ebbe un'efficacia del 64% nella prevenzione e accorcio' significativamente la durata della febbre di 1.27 giorni (Demicheli 2000). La rimantidina potrebbe anche essere efficace nei bambini (Clover 1986, Crawford 1988).

Resistenza

Mutazioni puntiformi nel gene M che portano a cambi di amminoacidi nella proteina M2 possono portare ad alti livelli di resistenza alla rimantidina. I mutanti sono virulenti e trasmissibili come il virus selvatico e causano una malattia influenzale tipica. Tali ceppi possono svilupparsi in un terzo dei pazienti che ricevono trattamento, anche se in individui immunocompromessi la percentuale puo' essere anche piu' elevata (Englund 1998). Virus A dell'influenza resistenti ai farmaci (H3N2) possono essere ottenuti da bambini e da adulti trattati con rimantidina a soli due giorni dall'inizio del trattamento (Hayden 1991).

La trasmissibilita' e' un aspetto importante da tenere in considerazione quando si usa la rimantidina. Uno studio condotto in precedenza ha dimostrato il fallimento nella prevenzione dell'infezione con influenza apparentemente dovuta alla trasmissione di ceppi virali resistenti ai farmaci. Lo studio concluse che la rimantidina e' ineffettiva nella protezione di familiari da infezione con influenza A (Hayden 1989).

Il virus aviario dell'influenza sottotipo H5N1, che e' stato associato con malattia umana nell'est asiatico fra il tardo 2003 e l'inizio del 2004, e' resistente alla rimantidina (residuo asparagina nella posizione 31 della proteina M2) (Li 2004).

Negli ultimi dieci anni la resistenza ai farmaci amantidina e rimantidina e' aumentata dallo 0.4% al 12.3% (Bright 2005).

Interazione coi farmaci

Non sono state identificate interazioni clinicamente sostanziali fra la rimantidina ed altri farmaci. Sembra che la cimetidina riduca l'eliminazione della rimantidina del 18% (Holazo 1989). L'acetaminophen riduce le concentrazioni di picco e i valori AUC per la rimantidina dell'11%. L'aspirina riduce le concentrazioni di picco nel plasma e la AUC per la rimantidina di circa il 10%.

Raccomandazioni per l'uso

Nell'Unione Europea, i prodotti medicinali che contengono rimantidina sono stati approvati su base nazionale (per informazioni fare riferimento alle informazioni sulla prescrizione).

Negli Stati Uniti la rimantidina ha la licenza per la profilassi in adulti e bambini, per il trattamento, la rimantidina e' licenziata solo per l'uso negli adulti. La rimantidina (Flumadine®) e' disponibile come pillole coperte con film di 100 mg e come sciroppo per la somministrazione orale.

Adulti

Negli US la dose raccomandata sia per la **prfilassi** che per il **trattamento** e' 100 mg bid.

Una riduzione della dose a 100 mg al giiorno e' raccomandata in pazienti con

- Severa disfunzione epatica
- Fallimeto renale (CrCl ≤ 10 ml/min)
- Pazienti anziani in casa di riposo (Patriarca 1984, Monto 1995).

Pazienti con un qualunque grado di insufficenza renale dovrebbero essere monitorati con attenzione, con aggiustamenti nel dosaggio se necessari.

Per il trattamento con la rimantidina la somministrazione dovrebbe iniziare entro 48 ore dall'inizio dei sintomi e dei segni di infezione con influenza A. La terapia e' consigliata per sette giorni dall'inizio dei sintomi.

Bambini

Negli Stati Uniti la rimantidina ha la licenza nei bambini solo per uso profilattico. Bambini di eta' inferiore ai 10 anni dovrebbero ricevere 5mg/kg ma non eccedere i 150 mg. Bambini di eta' uguale o superiore ai 10 anni ricevono la stessa dose degli adulti.

Avvertenze

La rimantidina deve essere usata con cautela in pazienti con epilessia.

Sommario

Nome commerciale: Flumadine®

Classe del farmaco: inibitore M2

Indicazioni: profilassi (bambini e adulti) e trattamento (solo negli adulti) delle infezioni causate da influenza A. Il trattamento deve essere iniziato entro 48 ore dall'inizio dei sintomi.

Dose standard per il trattamento: 100 mg bid.

Una riduzione della dose a 100 mg/die e' raccomandata nei pazienti con disfunzione epatica grave, fallimento renale (CrCl ≤ 10 ml/min) e in pazienti anziani in casa di riposo.

Dose standard per la profilassi: 100 mg bid.

Una riduzione della dose a 100 mg/die e' raccomandata in pazienti con disfunzione epatica grave, fallimento renale (CrCl ≤ 10 ml/min) e in pazienti anziani in casa di riposo. La dose raccomandata per bambini di eta' inferiore ai 10 anni e' 5mg/kg ma non superiore ai 150 mg. La dose raccomandata per i bambini di eta' superiore o uguale a 10 anni e' equivalente a quella degli adulti.

Farmacocinetiche: il picco della concentrazione nel plasma si raggiunge a 6 ore dalla somministrazione orale. La vita media di eliminazione e' 30 ore. L'eliminazione e' prolungata negli anziani. Il metabolismo e' esteso nel fegato – meno del 25% e' secreto immutato nell'urina. La concentrazione nel plasma e' aumentata in pazienti con insufficenza renale ed epatica grave.

Interazioni: non sono riportate interazioni significative con altri farmaci.

Effetti collaterali: sintomi gastrointestinali

Referenze

1. Anderson EL, Van Voris LP, Bartram J, Hoffman HE, Belshe RB. Pharmacokinetics of a single dose of rimantadine in young adults and children. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1140-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3662473 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=3662473
2. Belshe RB, Smith MH, Hall CB, Betts R, Hay AJ. Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. J Virol 1988; 62: 1508-12. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3282079
3. Belshe RB, Burk B, Newman F, Cerruti RL, Sim IS. Resistance of influenza A virus to amantadine and rimantadine: results of one decade of surveillance. J Infect Dis 1989; 159: 430-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2915166
4. Brady MT, Sears SD, Pacini DL, et al. Safety and prophylactic efficacy of low-dose rimantadine in adults during an influenza A epidemic. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 1633-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2285274
5. Bright RA, Medina MJ, Xu X, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. Lancet 2005; 366: 1175-81. Epub 2005 Sep 22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16198766
6. Bui M, Whittaker G, Helenius A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. J Virol 1996; 70: 8391-401. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8970960 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/reprint/70/12/8391?pmid=8970960
7. Capparelli EV, Stevens RC, Chow MS, Izard M, Wills RJ. Rimantadine pharmacokinetics in healthy subjects and patients with end-stage renal failure. Clin Pharmacol Ther 1988; 43: 536-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3365917
8. CDC 2006. CDC Recommends against the Use of Amantadine and Rimantadine for the Treatment or Prophylaxis of Influenza in the United States during the 2005-06 Influenza Season. Available from http://www.cdc.gov/flu/han011406.htm - Accessed 13 February 2006.
9. Clover RD, Crawford SA, Abell TD, Ramsey CN Jr, Glezen WP, Couch RB. Effectiveness of rimantadine prophylaxis of children within families. Am J Dis Child 1986; 140: 706-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3521258
10. Clover RD, Waner JL, Becker L, Davis A. Effect of rimantadine on the immune response to influenza A infections. J Med Virol 1991; 34: 68-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1885945
11. Crawford SA, Clover RD, Abell TD, Ramsey CN Jr, Glezen P, Couch RB. Rimantadine prophylaxis in children: a follow-up study. Pediatr Infect Dis J 1988; 7: 379-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3292997
12. Demicheli V, Jefferson T, Rivetti D, Deeks J. Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. Vaccine 2000; 18: 957-1030. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10590322
13. Dolin R, Reichman RC, Madore HP, Maynard R, Linton PN, Webber-Jones J. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. N Engl J Med 1982; 307: 580-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7050702
14. Doyle WJ, Skoner DP, Alper CM, et al. Effect of rimantadine treatment on clinical manifestations and otologic complications in adults experimentally infected with influenza A (H1N1) virus. J Infect Dis 1998; 177: 1260-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9593010 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/cgi-bin/resolve?JIDv177p1260PDF

15. Englund JA, Champlin RE, Wyde PR, et al. Common emergence of amantadine- and rimantadine-resistant influenza A viruses in symptomatic immunocompromised adults. Clin Infect Dis 1998; 26: 1418-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9636873 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/cgi-bin/resolve?CIDv26p1418PDF
16. Hall CB, Dolin R, Gala CL, et al. Children with influenza A infection: treatment with rimantadine. Pediatrics 1987; 80: 275-82. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3302925
17. Hayden FG, Minocha A, Spyker DA, Hoffman HE. Comparative single-dose pharmacokinetics of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride in young and elderly adults. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 216-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3834831 - Fulltext at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=3834831
18. Hayden FG, Monto AS. Oral rimantadine hydrochloride therapy of influenza A virus H3N2 subtype infection in adults. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29: 339-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3521480
19. Hayden FG, Belshe RB, Clover RD, Hay AJ, Oakes MG, Soo W. Emergence and apparent transmission of rimantadine-resistant influenza A virus in families. N Engl J Med 1989; 321: 1696-702. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2687687
20. Hayden FG, Sperber SJ, Belshe RB, Clover RD, Hay AJ, Pyke S. Recovery of drug-resistant influenza A virus during therapeutic use of rimantadine. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1741-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1952841
21. Holazo AA, Choma N, Brown SY, Lee LF, Wills RJ. Effect of cimetidine on the disposition of rimantadine in healthy subjects. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 820-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2764530 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=2764530
22. Jefferson T, Deeks JJ, Demicheli V, Rivetti D, Rudin M. Amantadine and rimantadine for preventing and treating influenza A in adults. Cochrane Database Syst Rev 2004; CD001169. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15266442
23. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. Lancet 2006; 367: 303-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16443037
24. Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature 2004; 430: 209-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15241415
25. Monto AS, Ohmit SE, Hornbuckle K, Pearce CL. Safety and efficacy of long-term use of rimantadine for prophylaxis of type A influenza in nursing homes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2224-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8619572 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/reprint/39/10/2224
26. Patriarca PA, Kater NA, Kendal AP, Bregman DJ, Smith JD, Sikes RK. Safety of prolonged administration of rimantadine hydrochloride in the prophylaxis of influenza A virus infections in nursing homes. Antimicrob Agents Chemother 1984; 26: 101-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=6476812
27. Stephenson I, Nicholson KG. Influenza: vaccination and treatment. Eur Respir J 2001; 17: 1282-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11491177 - Full text at http://erj.ersjournals.com/cgi/content/full/17/6/1282
28. Sugrue RJ, Hay AJ. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. Virology 1991; 180: 617-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1989386
29. Wills RJ, Belshe R, Tomlinsin D, et al. Pharmacokinetics of rimantadine hydrochloride in patients with chronic liver disease. Clin Pharmacol Ther 1987; 42: 449-54. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3665342
30. Wintermeyer SM, Nahata MC. Rimantadine: a clinical perspective. Ann Pharmacother 1995; 29: 299-310. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7606077

Zanamivir

Bernd Sebastian Kamps and Christian Hoffmann

Introduzione

Lo zanamivir e' una polvere inalata oralmente al momento approvata per il trattamento dell'influenza A e B in 19 nazioni e per la profilassi in due nazioni. Lo zanamivir e' un inibitore competitivo della glicoproteina neuraminidasi, che e' essenziale nel ciclo infettivo dei virus influenzali. Lo zanamivir imita l'acido sialico, che e' il substrato naturale della neuraminidasi (Varghese 1992, Varghese 1995).

Lo zanamivir somministrato come inalazione, risulta nell'erogazione diretta al tratto respiratorio, dove la sua concentrazione e' stata calcolata essere di piu' di 1,000 volte la IC_{50} per la neuraminidasi. Gli effetti inibitori iniziano entro 10 secondi.

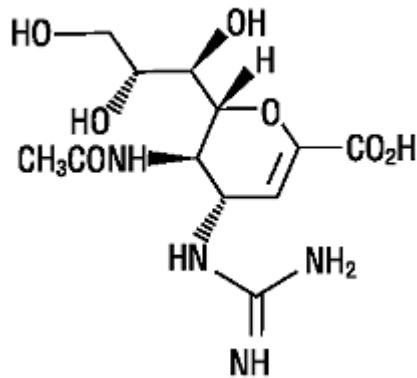
Quando si sospetta un coinvolgimento sistemico dell'infezione influenzale – come e' stato suggerito recentemente da certi casi di influenza aviaria H5N1 in esseri umani (de Jong 2005) – lo zanamivir potrebbe non essere il farmaco indicato.

Durante gli anni recenti, a cusa di certi eventi c'e' stato un cambiamento nelle informazioni che riguardano la prescrizione di zanamivir che adesso contengono avvertenze contro broncospasmo, dispnea, sfogo, orticaria, e reazioni di tipo allergico che includono edema del viso e orofaringeo. Tuttavia, esclusi questi rari episodi,il farmaco ha un buon profilo di sicurezza se il trattamento viene iniziato precocemente (Hayden 1997).

La co-somministrazione dello zanamivir inalato oralmente con vaccino antinfluenzale trivalente inattivato non sembra avere effetti avversi sulla produzione di anticorpi antiemagglutinina (Webster 1999); una risposta anticorpale protettiva si sviluppa entro 12 giorni (Cox 2001).

Struttura

Il nome chimico dello zanamivir e' acido 5-(acetylamino)-4-[(aminoiminomethyl)-amino]-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-

glycero-D-galacto-non-2-en onico. La formula strutturale e' la seguente:

Farmacocinetiche

I dati sullo zanamivir inalato oralmente indicano che il 10-20% del composto attivo arriva ai polmoni. Il resto si deposita nell'orofaringe e circa il 4-17% della dose inalata viene assorbito sistematicamente. Le concentrazioni picco nel siero vengono raggiunte entro 1-2 ore dopo una dose di 10 mg. Il legame alle proteine del plasma e' limitato (<10%). Lo zanamivir viene eliminato inalterato nell'urina con la completa escrezione di una dose singola entro 24 ore (Cass 1999b). La vita media dello zanamivir nel siero dopo somministrazione via inalazione orale varia dalle 2.5 alle 5.1 ore.

Studi hanno dimostrato che lo zanamivir somministrato per via intravenosa viene distribuito alla mucosa dell'apparato respiratorio ed e' protettivo contro infezione e malattia in seguito a inoculazione sperimentale del virus A dell'influenza umana (Calfee 1999).

Tossicita'

Lo zanamivir ha un buon profilo di sicurezza e' il rischio generale di occorrenza di eventi respiratori e' basso (Loughlin 2002). Risultati di studi su animali *in vivo* e *in vitro* suggeriscono che lo zanamivir ha bassa tossicita' acuta e tossicita' sistemica non significativa o irritabilita' del tratto respiratorio con esposizione del

plasma a piu' di 100 volte l'esposizione durante l'uso clinico (Freund 1999).

I dosaggi raccomandati per lo zanamivir generalmente non hanno effetti avversi sulle funzioni polmonari in pazienti con malattie respiratorie. Tuttavia, in certi pazienti, sono stati riportati broncospasmo e un declino della funzionalita' polmonare (FEV1 o picco del flusso espiratorio) dopo somministrazione di zanamivir. Nella maggioranza dei casi questi pazienti soffrivano di malattie respiratorie concomitanti come asma o malattia polmonare ostruttiva cronica. A causa di cio' lo zanamivir e' sconsigliato per il trattamento di pazienti con concorrente malattia respiratoria. Il trattamento con zanamivir dovrebbe anche essere sospeso in pazienti che sviluppano broncospasmo o che mostrano un declino della funzione respiratoria. Se i sintomi sono gravi, e' possibile che siano necessari trattamento immediato e ospitalizzazione.

Raramente possono verificarsi durante il trattamento con zanamivir reazioni allergiche, incluso edema orofaringeo e gravi sfoghi della pelle. In questi casi, la somministrazione del farmaco deve essere sospesa e si deve iniziare un trattamento appropriato per la condizione sviluppata.

E' stato riportatp che la frequenza di altri effetti colleterali e' approssimativamente identica sia nei gruppi trattati col farmaco che nei gruppi trattati con placebo: diarrea, nausea, giramento di capo, mal di testa, meno frequentemente malessere, dolori addominali ed orticaria si verificarono con le stesse frequenze e potrebbero essere dovuti al lattosio usato come veicolo per l'inalazione. Le anomalie piu' frequenti ossevate in laboratorio durante studi di trattamento in Fase 3 compresero incremento degli enzimi epatici e CPK, linfopenia, e neutropenia. Questi vennero riportati con proporzioni simili in recipienti di zanamivir e in recipienti di placebo in forma del veicolo lattosio con malattia acuta con caratteristiche simili all'influenza (Relenza 2003).

Tuttavia in bambini di eta' fra i 5 e i 12 anni, sintomi e segni nasali (zanamivir 20%, placebo 9%), tosse (zanamivir 16%, placebo 8%), e disturbi e dolore alla gola/tonsille (zanamivir 11%, placebo 6%) vennero riportati piu' frequentemente con lo zanamivir che con il placebo. In un sottogruppo con malattia respiratoria cronica, eventi avversi del basso apparato respiratorio (descritti come asma, tosse o infezioni respiratorie virali che possono includere sintomi con caratteristiche simili all'influenza) furono riportati in 7 su 7 recipienti di zanamivir e in 5 su 12 recipienti di placebo.

Le seguenti reazioni avverse sono state identificate dopo l'uso commerciale di zanamivir, ma non e' possibile stabilire in modo fidato la loro frequenza o stabilire una relazione causativa all'esposizione a zanamivir (Relenza 2003):

- Reazioni allergiche o di tipo allergico incluso edema orofaringeo.
- Aritmia, sincope.
- Convulsioni.
- Broncospasmo, dispnea.

Non e' stato studiato l'effetto dello zanamivir in gravidanza. In studi animali, lo zanamivir non ha causato difetti alla nascita o altri problemi.

In ratti lo zanamivir viene secreto nel latte, ma l'effetto dello zanamivir non e' stato studiato durante l'allattamento e non esistono informazioni sulla possibile secrezione di zanamivir in latte umano.

Efficacia

L'inalazione con zanamivir riduce il tempo medio di alleggerimento dei principali sintomi dell'influenza fino a 2.5 giorni se somministrato entro 48 ore dall'inizio dei sintomi. Questi benefici sembrano particolarmente marcati in pazienti gravemente malati e in individui di eta' ≥ 50 anni con malattie concomitanti o che sono considerati ad alto rischio. Pazienti con temperature piu' basse o con sintomi meno severi sembrano ricevere meno benefici dal trattamento con zanamivir.

Quando viene usato per la profilassi, lo zanamivir riduce in maniera significativa il numero di famiglie con nuovi casi di influenza quando viene paragonato con il placebo, e ha mostrato la prevenzione di nuovi casi di influenza in strutture di cura a lungo termine.

Trattamento

La prima esperienza clinica con zanamivir incluse pazienti da studi separati e randomizzati, condotti in doppio cieco in 38 centri nel nord America e 32 centri in Europa nel 1994-1995. Questi studi dimostrarono nei pazienti trattati una riduzione di circa un giorno per l'attenuazione dei sintomi (4 contro 5 giorni) (Hayden 1997).

Un beneficio anche maggiore del trattamento (3 giorni) fu rivelato in pazienti che mostrarono sintomi gravi al momento dell'inizio del trattamento (Monto 1999). Un beneficio dopo 3 giorni di trattamento venne anche osservato in pazienti di eta' > 50 anni, in confronto con 1 giorno in pazienti < 50 anni. In pazienti ad "alto rischio" venne osservato un beneficio a 2.5 giorni di trattamento (Monto 1999). In aggiunta, e' stato dimostrato che lo zanamivir e' effettivo in pazienti a rischio di sviluppare complicazioni dovute all'influenza come persone di eta' ≥ 65 anni, persone con malattie croniche come asma, malattia polmonare ostruttiva, malattie cardiovascolari, diabete mellito, e pazienti immunocompromessi (Lalezari 2001).

Le infezioni con influenza possono portare a complicazioni nel tratto respiratorio che richiedono trattamento con antibiotici. Una meta-analisi di 7 studi clinici ha rilevato che il 17% di recipienti di placebo svilupparono eventi respiratori che necessitarono l'uso di antibiotici, principalmente a causa di bronchite acuta o sinusite acuta, mentre l'incidenza di eventi respiratori che necessitarono l'uso di antibiotici nei pazienti trattati con zanamivir fu dell' 11% (Kaiser 2000b). Bisogna pero' notare che questi risultati sono in discussione. In un caso di un ampio piano di cura ben pianificato (> 2,300 pazienti trattati), venne riscontrata una distribuzione delle complicazioni da influenza simile nei pazienti trattati con zanamivir e in quelli non trattati (Cole 2002).

Profilassi

Una serie di studi randomizzati hanno dimostrato l'efficacia dello zanamivir nella prevenzione dell'influenza. In uno studio con adulti sani, 10 mg una volta al giorno o placebo venne somministrato all'inizio di un'epidemia influenzale. La profilassi venne proseguita per un periodo di 4 settimane. Lo zanamivir risulto' efficace per il 67% nel prevenire influenza clinica (6% [34/554] influenza clinica nel gruppo placebo conto 2% [11/553] nel gruppo zanamivir) ed efficace per l'84% nel prevenire malattia febbrile (Monto 1999b).

In un altro studio clinico vennero analizzate famiglie con da due a cinque membri e almeno un bambino di eta' uguale o superiore ai cinque anni. Appena un famigliare mostro' malattia simile ad influenza, la famiglia ricevette o zanamivir (10 mg inalati una volta al giorno per 10 giorni) o placebo. Il 4% delle famiglie trattate con zanamivir mostrarono almeno un nuovo caso di influenza, contro il 19% delle famiglie trattate con placebo. La durata media dei sintomi fu di 2.5 giorni piu' breve nel gruppo trattato con zanamivir che nel gruppo trattato con placebo (0.5 contro 7.5 giorni) (Hayden 2000). Una riduzione del rischio simile venne mostrata in uno studio in cui lo zanamivir venne

somministrato in seguito a contatto con un caso all'indice di malattia simile all'influenza (Kaiser 2000).

In uno studio di prevenzione dell'influenza in famiglie con zanamivir inalato, il 4% dei membri trattati con zanamivir contro il 19% dei membri trattati con placebo mostro' almeno 1 caso che sviluppo' influenza sintomatica confermata in laboratorio (efficacia della protezione dell'81%). L'efficacia protettiva venne rivelata in proporzioni ugualmente elevate per individui (82%) e contro entrambi i tipi di influenza A e B (78% e 85% rispettivamente per gruppi familiari) (Monto 2002).

Bambini

In uno studio su bambini di eta' compresa fra i cinque e i dodici anni, lo zanamivir ridusse il tempo medio per il raggiungimento di alleviamento dei sintomi di 1.25 giorni quando confrontato con il placebo. Pazienti trattati con zanamivir ritornarono alle loro attivita' normali piu' velocemente e ebbero meno necessita' di farmaci per ridurre la febbre in confronto a pazienti trattati con placebo (Hedrick 2000).

Lo zanamivir e' quindi sicuro per il trattamento dei bambini – se riescono a prenderlo. I bambini, specialmente se di eta' inferiore agli otto anni, sono normalmente in difficolta' ad usare in modo appropriato il sistema di erogazione per lo zanamivir da inalazione (perche' non producono un flusso inspiratorio misurabile attraverso il diskhaler o perche' producono tassi di picco inspiratorio minori di quelli che sono considerati ottimali per il sistema). Dato che la mancanza di tasso del flusso misurabile e' correlata con inadeguate o, per essere sinceri, concentrazioni nel siero non rilevabili, coloro che possono prescriverlo dovrebbero valutare con cura l'abilita' dei bambini ad usare il sistema di erogazione dello zanamivir quando prendono in considerazione l'uso di questo farmaco nei bambini. Quando lo zanamivir viene prescritto per i bambini, e' necessario che la somministrazione avvenga sotto la supervisione di un adulto e con la dovuta attenzione per garantire un uso appropriato del sistema di erogazione (Relenza 2003).

Situazioni particolari

Situazioni particolari in cui lo zanamiviri e' stato usato includono leucemia linfoblastica (Maeda 2002) e trapianto di cellule staminali allogeniche (Johny 2002). Nel secondo caso non venne rivelata tossicita' attribuibile allo zanamivir, ma risoluzione rapida dei

sintomi dell'influenza. Non ci fu in questi pazienti mortalita' dovuta all'influenza.

Ceppi di influenza aviaria

In uno studio in topi del 2000 lo zanamivir mostro' efficacia nel trattamento dei virus aviari dell'influenza H9N2, H6N1, e H5N1 trasmissibili ai mammiferi (Leneva 2001).

Resistenza

Lo sviluppo di resistenza e' raro. Al momento non sono stati isolati virus resistenti allo zanamivir da individui immunocompetenti successivamente al trattamento. In aggiunta, tutti i ceppi resistenti allo zanamivir selezionati *in vitro* fin'ora hanno vitalita' diminuita. Le mutazioni per la resistenza note al momento sono sia specifiche per il sottotipo virale che per il farmaco (McKimm-Breschkin 2003).

C'e' evidenza per diversi tipi di sucettibilita' e resistenza incrociata fra gli inibitori della neuraminidasi (Mishin 2005, Yen 2005), ma non ci sono studi al momento che abbiano valutato il rischio di emergenza di resistenza incrociata nell'uso clinico.

Interazioni coi farmaci

Lo zanamivir e' somministrato per inalazione e un livello basso di assorbimento del farmaco risulta in concentrazioni del siero basse e esposizione sistemica modesta allo zanamivir dopo inalazione. Lo zanamivir non viene metabolizzato e il potenziale per interazioni farmaco-farmaco di rilevanza clinica e' basso (Cass 1999b). Lo zanamivir non e' substrato ne' agisce sugli isoenzimi del citocromo P450 (CYP) (CYP1A1/2, 2A6, 2C9, 2C18, 2D6, 2E1, e 3A4) in microsomi epatici umani. Non esiste una base teorica per predirre interazioni metaboliche fra zanamivir e altri composti somministrati allo stesso tempo (Daniel 1999).

Raccomandazioni per l'uso

- Lo zanamivir e' indicato per il trattamento di malattia acuta senza complicazioni dovuta ai virus A e B dell'influenza in pazienti adulti e pediatrici (EU: di eta' superiore ai 12 anni; US di eta' superiore ai 7 anni) che sono sintomatici da non piu' di due giorni.

- Lo zanamivir non e' raccomandato per il trattamento di pazienti con concomitante malattia delle vie respiratorie (come asma o malattia polmonare ostruttiva cronica).

Lo zanamivir (Relenza®) viene somministrato per inalazione a causa della sua bassa biodisponibilita' orale. Ogni Relenza® Rotadisk contiene 4 blister rivestiti con alluminio e ogni blister contiene 5 mg di zanamivir (piu' 20 mg di lattosio contenente proteine del latte). Il contenuto di ogni blister viene inalato usando un erogatore di plastica chiamato "Diskhaler". Nel diskhaler il blister viene punturato e lo zanamivir viene disperso nel flusso di aria quando il paziente inala attraverso il bocchino. La quantita' di farmaco che raggiunge l'apparato respiratorio dipende da fattori relativi al paziente come il flusso inspiratore.

E' consigliabile che ai pazienti venga insegnato come usare il sistema di erogazione, e le istruzioni dovrebbero includere una dimostrazione – e questo protrebbe essere difficile nella pratica medica quotidiana. Quando viene prescritto nei bambini, lo zanamivir dovrebbe essere usato solo sotto supervisione ed istruzione adulta.

Ci sono dubbi sull'abilita' degli anziani ad usare il sistema di erogazione dello zanamivir. Uno studio di 73 pazienti (di eta' compresa fra i 71 e i 99 anni) in reparti che dispensano cure in situazioni acute per anziani in un grande ospedale ha rilevato che la maggior parte degli anziani non fu in grado di usare il sistema di inalazione e che il trattamento con zanamivir negli anziani con influenza e' probabilmente ineffettivo (Diggory 2001).

Dosaggio

La dose raccomandata per il trattamento dell'influenza con zanamivir in pazienti adulti e pediatrici di eta' superiore ai 7 anni e' 10 mg bid (= due volte al giorno come 2 inalazioni consecutive di blister da 5 mg) per 5 giorni.

Nel primo giorno del trattamento, e' consigliato che le due dosi siano somministrate con un intervallo di almeno due ore. Nei giorni successivi, e' consigliato che le dosi dovrebbero siano somministrate con un intervallo di circa 12 ore.

Non e' richiesto un aggiustamento della dose in pazienti con danno renale (Cass 1999a).

Pazienti con disfunzionalita' polmonare dovrebbero sempre avere a disposizione un broncodilatatore ad azione rapida e sospendere

il trattamento con zanamivir se si sviluppano difficolta' respiratorie.

Sommario

Nome commerciale: Relenza®

Classe del farmaco: Inibitore della neuraminidasi.

Produttore: GlaxoSmithKline.

Indicazioni: Lo zanamivir e' indicato per il trattamento di malattia acuta senza complicazioni dovuta a virus dell'influenza A e B in pazienti adulti e pediatrici (EU: di eta' superiore ai 12 anni; US di eta' superiore ai 7 anni) che sono sintomatici da non piu' di due giorni.

Dosaggio standard per il trattamento: 10 mg bid (= due volte al giorno come 2 inalazioni consecutive di blister da 5 mg) per 5 giorni.

Dosaggio standard per la profilassi: nella maggior parte delle nazioni,lo zanamivir non e' stato approvato per la profilassi.

Farmacocinetiche: dal 10 al 20% del composto attivo raggiunge i polmoni, il resto e' depositato nel cavo orofaringeo. Dal 4 al 7% della dose inalata e' assorbito sistemicamente. Concentrazioni di picco nel siero vengono raggiunte entro 1-2 ore. Il legame con le proteine del plasma e' limitato (<10%). Secrezione nell'urina di farmaco non modificato. La vita media nel siero dopo somministrazione via inalazione orale e' di 2.5-5.1 ore.

Avvertenze: lo zanamivir non e' raccomandato per il trattamento di pazienti con concomitante malattia delle vie respiratorie (come asma o malattia cronica polmonare ostruttiva).

Interazioni: non sono previste sulla base di dati ottenuti da studi *in vitro* interazioni del farmaco clinicamente significative con altri farmaci.

Effetti collaterali: lo zanamivir presenta un buon profilo della sicurezza e il rischio totale per lo sviluppo di eventi respiratori e' basso.

Informazioni per il paziente: l'uso di zanamivir per il trattamento dell'influenza non ha dimostrato ridurre il rischio di trasmissione dell'influenza ad altri.

Esiste un rischio di broncospasmo specialmente quando sono presenti malattie delle vie respiratorie concomitanti, e i pazienti dovrebbero sospendere il trattamento con zanamivir e consultare il loro medico se dovessero provare sintomi respiratori aumentati durante il trattamento come un peggioramento del fischio, fiato corto, o altri segnali o sintomi di broncospasmo. Un paziente con asma o che soffre di malattia cronica ostruttiva polmonare deve essere messo al corrente dei rischi e dovrebbe sempre avere a disposizione un broncodilatatore ad azione rapida.

Si dovrebbe consigliare a pazienti a cui deve essere somministrato un broncodilatatore contemporaneamente allo zanamivir di usare il broncodilatatore prima di usare lo zanamivir.

Conservare a 25°C (77°F); escursioni di temperatura permesse fra i 15° e i 30°C (da 59° a 86°F).

Internet sources:

USA: http://influenzareport.com/link.php?id=5

Referenze

1. Calfee DP, Peng AW, Cass LM, Lobo M, Hayden FG. Safety and efficacy of intravenous zanamivir in preventing experimental human influenza A virus infection. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1616-20. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10390212 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/full/43/7/1616

2. Cass LM, Efthymiopoulos C, Marsh J, Bye A. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of intravenous zanamivir. Clin Pharmacokinet 1999a; 36: Suppl 1:13-9 Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10429836

3. Cass LM, Efthymiopoulos C, Bye A. Pharmacokinetics of zanamivir after intravenous, oral, inhaled or intranasal administration to healthy volunteers. Clin Pharmacokinet 1999b; 36: Suppl 1:1-11 Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10429835

4. Cole JA, Loughlin JE, Ajene AN, Rosenberg DM, Cook SE, Walker AM. The effect of zanamivir treatment on influenza complications: a retrospective cohort study. Clin Ther 2002; 24: 1824-39. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12501877

5. Cox RJ, Mykkeltvedt E, Sjursen H, Haaheim LR. The effect of zanamivir treatment on the early immune response to influenza vaccination. Vaccine 2001; 19: 4743-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11535325

6. Daniel MJ, Barnett JM, Pearson BA. The low potential for drug interactions with zanamivir. Clin Pharmacokinet 1999; 36: Suppl 1:41-50 Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10429839

7. de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, et al. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. N Engl J Med 2005; 352: 686-91. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15716562 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/352/7/686

8. Diggory P, Fernandez C, Humphrey A, Jones V, Murphy M. Comparison of elderly people's technique in using two dry powder inhalers to deliver zanamivir: randomised controlled trial. BMJ 2001; 322: 577-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11238150 - Full text at http://bmj.bmjjournals.com/cgi/content/full/322/7286/577

9. Freund B, Gravenstein S, Elliott M, Miller I. Zanamivir: a review of clinical safety. Drug Saf 1999; 21: 267-81. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10514019

10. Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, et al. Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. N Engl J Med 1999; 341: 1336-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10536125 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/341/18/1336

11. Hayden FG, Gubareva LV, Monto AS, et al. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. Zanamivir Family Study Group. N Engl J Med 2000; 343: 1282-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11058672 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/343/18/1282

12. Hayden FG, Gubareva LV, Monto AS, et al. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. Zanamivir Family Study Group. N Engl J Med 2000; 343: 1282-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11058672 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/343/18/1282

13. Hayden FG, Osterhaus AD, Treanor JJ, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenzavirus infections. GG167 Influenza Study Group. N Engl J Med 1997; 337: 874-80. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9302301 - Full text at http://content.nejm.org/cgi/content/full/337/13/874

14. Hedrick JA, Barzilai A, Behre U, et al. Zanamivir for treatment of symptomatic influenza A and B infection in children five to twelve years of age: a randomized controlled trial. Pediatr Infect Dis J 2000; 19: 410-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10819336

15. Johny AA, Clark A, Price N, Carrington D, Oakhill A, Marks DI. The use of zanamivir to treat influenza A and B infection after allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2002; 29: 113-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11850704

16. Kaiser L, Henry D, Flack NP, Keene O, Hayden FG. Short-term treatment with zanamivir to prevent influenza: results of a placebo-controlled study. Clin Infect Dis 2000; 30: 587-9. http://amedeo.com/lit.php?id=10722450 - Full t. at http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v30n3/990655/990655.html

17. Kaiser L, Keene ON, Hammond JM, Elliott M, Hayden FG. Impact of zanamivir on antibiotic use for respiratory events following acute influenza in adolescents and adults. Arch Intern Med 2000b; 160: 3234-40. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11088083 - Full text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/full/160/21/3234

18. Lalezari J, Campion K, Keene O, Silagy C. Zanamivir for the treatment of influenza A and B infection in high-risk patients: a pooled analysis of randomized controlled trials. Arch Intern Med 2001; 161: 212-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11176734 - Full text at http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/full/161/2/212

19. Leneva IA, Goloubeva O, Fenton RJ, Tisdale M, Webster RG. Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes encoding H5N1 internal proteins and are pathogenic in mammals. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1216-24. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11257037 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/full/45/4/1216

20. Loughlin JE, Alfredson TD, Ajene AN, et al. Risk for respiratory events in a cohort of patients receiving inhaled zanamivir: a retrospective study. Clin Ther 2002; 24: 1786-99. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12501874

21. Macdonald L. New influenza drugs zanamivir (Relenza) and oseltamivir (Tamiflu): unexpected serious reactions. CMAJ 2000; 163: 879-81, 883-5. http://InfluenzaReport.com/link.php?id=3

22. Maeda M, Fukunaga Y, Asano T, Migita M, Ueda T, Hayakawa J. Zanamivir is an effective treatment for influenza in children undergoing therapy for acute lymphoblastic leukemia. Scand J Infect Dis 2002; 34: 632-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12238587

23. McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2264-72. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12821478 - Full text at http://aac.asm.org/cgi/content/full/47/7/2264

24. Mishin VP, Hayden FG, Gubareva LV. Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4515-20. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16251290

25. Monto AS, Pichichero ME, Blanckenberg SJ, et al. Zanamivir prophylaxis: an effective strategy for the prevention of influenza types A and B within households. J Infect Dis 2002; 186: 1582-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12447733 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v186n11/020679/020679.html

26. Monto AS, Robinson DP, Herlocher ML, Hinson JM Jr, Elliott MJ, Crisp A. Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. JAMA 1999b; 282: 31-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10404908 - Full text at http://jama.ama-assn.org/cgi/content/full/282/1/31

27. Monto AS, Webster A, Keene O. Randomized, placebo-controlled studies of inhaled zanamivir in the treatment of influenza A and B: pooled efficacy analysis. J Antimicrob Chemother 1999; 44: Suppl : 23-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10877459 - Full text at http://jac.oxfordjournals.org/cgi/reprint/44/suppl_2/23

28. Relenza (zanamivir for inhalation). Research Triangle Park, NC: GlaxoSmithKline, 2003 (package insert). Accessed from http://www.InfluenzaReport.com/link.php?id=5

29. Varghese JN, McKimm-Breschkin JL, Caldwell JB, Kortt AA, Colman PM. The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. Proteins 1992; 14: 327-32. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1438172

30. Varghese JN, Epa VC, Colman PM. Three-dimensional structure of the complex of 4-guanidino-Neu5Ac2en and influenza virus neuraminidase. Protein Sci 1995; 4: 1081-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7549872 - Full text at http://www.proteinscience.org/cgi/content/abstract/4/6/1081

31. Webster A, Boyce M, Edmundson S, Miller I. Coadministration of orally inhaled zanamivir with inactivated trivalent influenza vaccine does not adversely affect the production of antihaemagglutinin antibodies in the serum of healthy volunteers. Clin Pharmacokinet 1999; 36: Suppl 1:51-8 Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10429840

32. Yen HL, Herlocher LM, Hoffmann E, et al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4075-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16189083